

Entwicklung zweier spezifischer Multiplex qPCRs  
für die Quantifizierung von *Pseudomonas*,  
*Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta*  
und *Staphylococcus* in Fleisch und erhitzten  
Fleischerzeugnissen

von Eunike Renate Marie Bahlinger geb. Brändl

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Entwicklung zweier spezifischer Multiplex qPCRs für die Quantifizierung von *Pseudomonas*,  
*Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* und *Staphylococcus* in Fleisch und erhitzten  
Fleischerzeugnissen

von Eunike Renate Marie Bahlinger geb. Brändl  
aus Ostfildern-Ruit

München 2021



Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit und Analytik

Arbeit angefertigt unter der Anleitung von: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Mitbetreuung durch: Prof. Dr. Karin Schwaiger  
Dr. Samart Dorn-In



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. Karin Weber

Tag der Promotion: 17.07.2021



*Meinem Mann und unserem Sohn*





## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Fleischverderb .....</b>	<b>16</b>
3.1.1	Begriffsbestimmungen .....	16
3.1.1.1	Fleisch .....	16
3.1.1.2	Verderb .....	17
3.1.2	Bakterielle Mikrobiota von Fleisch .....	18
3.1.2.1	Mikrobiota von Frischfleisch .....	18
3.1.2.2	Kontaminationsquellen .....	19
3.1.2.3	Fleisch als Nährsubstrat für Bakterien.....	22
3.1.3	Beeinflussende Faktoren .....	24
3.1.3.1	Intrinsische Faktoren .....	24
3.1.3.1.1	pH-Wert.....	24
3.1.3.1.2	a <sub>w</sub> -Wert.....	26
3.1.3.1.3	Nährstoffangebot .....	28
3.1.3.2	Extrinsische Faktoren.....	29
3.1.3.2.1	Temperatur.....	29
3.1.3.2.2	Atmosphäre .....	30
<b>3.2</b>	<b>Verderbserreger .....</b>	<b>34</b>
3.2.1	Übersicht .....	34
3.2.2	Ausgewählte Verderbserreger .....	35
3.2.2.1	<i>Brochothrix thermosphacta</i> .....	35
3.2.2.2	<i>Enterobacteriaceae</i> .....	37
3.2.2.3	<i>Pseudomonas</i> spp. ....	39
3.2.3	Interaktion zwischen Verderbserregern .....	41
<b>3.3</b>	<b>Kontamination von Fleisch mit <i>Staphylococcus</i> spp. ....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>Publikation .....</b>	<b>48</b>

---

<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>82</b>
5.1	Wachstum der Zielkeime auf verdorbenem Fleisch .....	82
5.2	Entwicklung der Multiplex qPCRs .....	86
5.3	Vergleich zwischen Kultur und Multiplex qPCRs.....	92
5.4	Untersuchung der Brühwürste mit artifiziell verdorbenem Fleisch .....	96
5.5	Untersuchung der Brühwurstproben aus dem Handel .....	99
5.6	Konsequenzen für den Verbraucherschutz .....	100
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>138</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

$a_w$	Wasseraktivität
AHLs	N-acyl Homoserin Laktone
<i>B.</i>	<i>Brochothrix</i>
<i>Bac.</i>	<i>Bacillus</i>
BPS	blown pack spoilage
°C	Grad Celsius
Cfu	Colony forming units
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CA-MRSA	Community-associated MRSA
<i>Car.</i>	<i>Carnobacterium</i>
<i>Clos.</i>	<i>Clostridium</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DFD-Fleisch	Fleisch, das dunkel (Dark), fest (Firm) und trocken (Dry) ist
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DNA	deoxyribonucleic acid
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Ent.</i>	<i>Enterococcus</i>
EG/EU	Europäische Gemeinschaft/ Europäische Union
g	Gramm
GHP	Good Hygiene Practice / Gute Hygienepaxis
GMP	Good Manufacturing Practice / Gute Herstellungspraxis
HACCP	Hazard analysis and critical control points
HA-MRSA	Healthcare-associated MRSA
KbE	Kolonie bildende Einheiten
LAB	Lactic acid bacteria / Milchsäurebakterien
<i>Lac.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LA-MRSA	Livestock-associated MRSA
<i>Leu.</i>	<i>Leuconostoc</i>
MA	modifizierte Atmosphäre

MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
Mec	Methicillin-Resistenzdeterminante
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
mV	Millivolt
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Nr.	Nummer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PMA	Propidium Monoazid
PSE-Fleisch	Fleisch, das blass(Pale), weich (Soft) und wässrig (Exudative) ist
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RA	relative accuracy
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomale RNA
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SE	<i>Staphylococcus</i> -Enterotoxine
spp.	species pluralis
SSO	specific spoilage organism(s)
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
VO	Verordnung
Δ	Delta (Differenz)

## 2 Einleitung

Die Verwertung von verdorbenem Fleisch in Lebensmitteln ist gemäß §3 der Lebensmittelhygieneverordnung (LMHV, 2016) und europaweit laut VO (EG) Nr. 178/2002 verboten. Dennoch werden immer wieder Fälle bekannt, in denen in betrügerischer Absicht verdorbenes Fleisch verwendet wurde (Handelsblatt, 2013). Hierbei handelt es sich um „Food Fraud“ oder Lebensmittelbetrug, was definiert wird durch die vorsätzliche Täuschung von Verbrauchern durch das Inverkehrbringen von Lebensmitteln, um damit wirtschaftliche Vorteile für den Lebensmittelunternehmer zu erlangen (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2020).

Verdorbenes Fleisch weist sensorische Veränderungen wie inakzeptable Gerüche, Verfärbungen und Texturveränderungen auf (Borch et al. 1996; Gram et al., 2002). Darüber hinaus verändert sich die Fleischmikrobiota und spezifische Verderbserreger nehmen überhand (Borch et al., 1996, Nychas et al., 2008).

Die Goldstandard-Methode für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Mikroorganismen ist deren kulturelle Anzucht. Voraussetzung dafür ist die Unversehrtheit der Mikroorganismen. Jedoch werden vegetative Zellen bei Temperaturen von 65 - 75 °C, wie beispielsweise bei der Brühwurstherstellung angewendet, inaktiviert (Borch et al., 1996). Somit kann der mikrobiologische Kontaminationslevel der verwendeten Rohwaren in hitzebehandelten Fleischerzeugnissen kulturell nicht mehr rekonstruiert werden. Da jedoch die Desoxyribonucleisäure (DNA) sehr hitzebeständig ist, kann diese auch von nicht mehr kultivierbaren Mikroorganismen mittels molekularbiologischer Methoden, z. B. mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR), amplifiziert und detektiert werden (Saiki et al., 1988).

Ziel der Studie war, eine quantitative PCR (qPCR) für den Nachweis von verdorbenem Fleisch in erhitzten Lebensmitteln zu entwickeln. Die dafür nötigen Kenntnisse der Dynamik der Fleischmikrobiota im Laufe des Verderbsprozesses wurden anhand artifizieller Verderbsversuche mit anschließenden mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen gewonnen. Hierauf basierend fokussieren sich die zwei entwickelten Multiplex qPCRs auf vier Bakteriengruppen, die häufig auf Fleisch vorkommen: *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* und *Staphylococcus* spp.



## 3 Literatur

### 3.1 Fleischverderb

#### 3.1.1 Begriffsbestimmungen

##### 3.1.1.1 Fleisch

Der Begriff „Fleisch“ wird in der Verordnung (EG) Nr. 853/2004, Anhang I Nr. 1.1. definiert als alle genießbaren Teile einschließlich Blut von Huftieren, Geflügel, Hasentieren, freilebendem Wild, Farmwild, Kleinwild und Großwild.

Die Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse (Neufassung vom 25.11.2015, zuletzt geändert durch die Bekanntmachung vom 17.04.2019) definieren Fleisch als alle Teile von geschlachteten oder erlegten warmblütigen Tieren, die zum menschlichen Verzehr vorgesehen sind (Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2015).

Werden Fleischerzeugnisse gewerbsmäßig hergestellt, so trifft auf die Bezeichnung der Zutat „Fleisch“ nur die Verwendung der Skelettmuskulatur mit eingelagertem oder anhaftendem Fett- und Bindegewebe, genauso wie eingelagerte Lymphknoten, Gefäßen, Nerven und Schweinespeicheldrüsen zu (Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2015). Bei Fleischerzeugnissen am Stück und solchen, die im Verbraucherhaushalt zubereitet werden, schließt die Bezeichnung „Fleisch“ auch eingewachsene Knochen und Knorpel ein, bei Schweinefleisch zudem auch Schwarte, wenn es sich um Teile aus Keule, Brust, Bauch, Schulter und Rückenspeck handelt (Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2015).

Die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 definiert zudem in Anhang I, Nr. 1.10. „frisches Fleisch“ als Fleisch, das aus Gründen der Haltbarmachung ausschließlich gekühlt, gefroren oder schnellgefroren, vakuumverpackt oder in kontrollierter Atmosphäre umhüllt wurde. Zudem muss frisches Fleisch beim Zerlegen, Entbeinen, Zurichten, Zerschneiden in Scheiben oder Würfel, Umhüllen und Verpacken bei einer Raumtemperatur von maximal 12 °C bearbeitet werden, und das Fleisch darf eine Temperatur von 7 °C nicht überschreiten (Anhang III, Abschnitt I, Kapitel V, Nummer 2b, VO (EG) Nr. 853/2004).



### 3.1.1.2 Verderb

Der Verderb von Lebensmitteln geht mit jeglicher Veränderung einher, mit der das Lebensmittel für den menschlichen Verzehr inakzeptabel wird (Hayes, 1985). Die Kombination mikrobiologischer und biochemischer Aktivitäten macht den Verderb von Lebensmitteln zu einem komplexen Vorgang (Huis in't Veld, 1996).

Generell wird der Verderb subjektiv vom Konsumenten beurteilt und unterliegt dem Einfluss von ökonomischen, kulturellen und individuell sensorischen Hintergründen (Nychas et al., 2008). Der Verderb kann offensichtlich sein, wie es zum Beispiel bei Schleimbildung, Insektenbefall, äußerlicher Beschädigung oder sichtbarem Wachstum von Mikroorganismen der Fall ist (Huis in't Veld, 1996). Auch die Abnahme von Nährstoffen unter die deklarierte Menge im Lebensmittel wird als Verderb angesehen (Singh und Anderson, 2004). Die häufigste Ursache für Lebensmittelverderb liegt in mikrobiellem Wachstum und manifestiert sich in Texturveränderung, Fehlverhalten, Geruchsveränderung, Schleimbildung und Verfärbung (Gram et al., 2002; Nychas et al., 2008). Es wird geschätzt, dass 33 % aller produzierten Lebensmittel weltweit durch Verderb für den Menschen verloren gehen (Batt, 2016).

Fleisch gehört zu den verderblichsten Lebensmitteln (Ercolini et al., 2006). Die Haltbarkeit wird nach Borch (1996) definiert als Lagerungsdauer bis zum Verderb. Voraussetzung für mikrobiellen Fleischverderb ist das Wachstum einer großen Anzahl an Bakterien (Borch et al., 1996). Durch variierende initiale Kontamination, Lagerungsbedingungen und Fleischzusammensetzung weichen die organoleptischen Veränderungen des Fleischverderbs von Fall zu Fall ab (Ercolini et al., 2006; Gill, 1983). Die Temperatur stellt die wichtigste Komponente für den Verderb und die Lebensmittelsicherheit von Fleisch dar (Koutsoumanis et al., 2006).

Von Fleischverderb kann gesprochen werden, wenn definierte Grenzwerte in Kolonie bildenden Einheiten pro Gramm bzw. pro Quadratcentimeter (KbE/g bzw. KbE/cm<sup>2</sup>) überschritten werden: 10<sup>7</sup> KbE/cm<sup>2</sup> als Grenzwert für Milchsäurebakterien (Lactic Acid Bacteria/LAB) und *Pseudomonas* spp. (EFSA, 2016; Kameník, 2013), 10<sup>7</sup> bis 10<sup>9</sup> KbE/cm<sup>2</sup> für die gesamte Keimzahl (Borch et al., 1996) und 10<sup>8</sup> KbE/g für mesophile aerobe Bakterien (Carrizosa et al., 2017). Abhängig von initialer Atmosphäre und anderen Wachstumsbedingungen, tritt nach sieben bis 14 Tagen der Fleischverderb bei kühlgelagertem Fleisch auf (Ercolini et al., 2006). Da es einen direkten Zusammenhang zwischen dem

Vorkommen von Verderbserregern und pathogenen Mikroorganismen auf Fleisch gibt, spielt der Fleischverderb zudem eine wichtige Rolle in der Risikobeurteilung (Koutsoumanis, 2009).

### **3.1.2 Bakterielle Mikrobiota von Fleisch**

#### **3.1.2.1 Mikrobiota von Frischfleisch**

Mikrobielles Wachstum stellt die wichtigste Größe in Bezug auf die Erhaltung der Qualität frischen Fleisches dar und ist der limitierende Faktor für dessen Haltbarkeit (Lambert et al., 1991). Während tiefes Muskelgewebe von Tieren, die unter guten hygienischen Bedingungen geschlachtet wurden, steril und somit frei von mikrobiellen Belastungen ist, wird die exponierte Fleischoberfläche durch Mikroorganismen kontaminiert (Gill, 1979; Lambert et al., 1991). Zur Kontamination kommt es während der Schlachtung, Weiterverarbeitung und dem Vertrieb des Fleisches (Labadie, 1999; Nychas et al., 2008). Die initiale Fleischmikrobiota variiert je nach Kontaminationsquelle (Dainty et al., 1983). Der Hauptanteil an Bakterien, die mit Fleisch assoziiert sind, befindet sich auf den ersten Millimetern der Oberfläche und stammt aus der Umwelt (Gill, 1979, 1983).

Die initiale Mikrobiota frischen Fleisches ist sehr komplex (De Filippis et al., 2013; Pennacchia et al., 2011). Nicht alle Bakterien der initialen Mikrobiota, sondern nur eine gewisse Fraktion, tragen - in Abhängigkeit der Lagerungsbedingungen - zum Fleischverderb bei, was dazu führt, dass die Keimdiversität im Laufe des Fleischverderbs abnimmt (Ayres, 1960; Chaillou et al., 2015; De Filippis et al., 2013; Gram et al., 2002; Jay et al., 2003; Nychas et al., 2008). De Filippis et al. (2013) zeigen beispielsweise in einer Studie, dass von 15 Bakterienstämmen, die auf frischem Rindfleisch am Tag der Schlachtung nachgewiesen wurden, nur fünf nach einer Woche bei dem inzwischen verdorbenen Fleisch wiedergefunden wurden.

Nach der Schlachtung soll das Fleisch unverzüglich auf 7 °C gekühlt werden (Verordnung (EG) Nr. 853/2004). Die bakterielle Fleischmikrobiota besteht aus kältetoleranten und mesophilen Bakterien, wovon nur die kältetolerante Fraktion bei Kühltemperaturen wächst (Gill und Newton, 1978). Eddy (1960) teilt kältetolerante Bakterien in psychrotrophe und psychrophile Keime ein: Psychrophile Keime wachsen bei Temperaturen von 5 °C und darunter und besitzen ein niedriges Temperaturoptimum, während psychrotrophe Keime bei Temperaturen von  $\leq 5$  °C, unabhängig von ihrem Temperaturoptimum, wachsen können.

Psychrophile und psychrotolerante *Clostridium* spp. wurden sowohl aus der Umwelt (Boden,

Schlamm und Abwässer), als auch von Haut, Faeces und Fleisch von Hauswiederkäuern, Rehen und Wildschweinen isoliert (Bonke et al., 2016; Brightwell und Clemens, 2012; Dorn-In et. al, 2018). Psychrophile und psychrotrophe *Clostridium* spp. werden über Faeces von Wiederkäuern ausgeschieden und gelangen so auf das Fell. Haut und Fell von Nutztieren sind folglich eine der Eintragsquellen von Bakterien während der Schlachtung, was das Vorkommen psychrophiler Bakterien auf frischem Fleisch erklärt (Broda et al., 2009).

**Tabelle 1:** Häufige Vertreter der Mikrobiota frischen Rind-, Schwein -und Geflügelfleisches

<b>Tierart</b>	<b>Mikrobiota des Fleisches</b>	<b>Quellen</b>
Rind	<i>Acinetobacter</i> spp. <i>B. thermosphacta</i> <i>Carnobacterium divergens</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Psychrobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp.	De Filippis et al. (2013) Pennacchia et al. (2011)
Schwein	<i>Acinetobacter</i> spp. <i>Flavobacterium</i> spp. <i>Macroccoccus</i> spp <i>Micrococcus</i> spp. <i>Moraxella</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp	Blickstad et al.(1981) Dainty et al. (1983) Dainty und Mackey (1992) Olsson et al. (2003)
Geflügel	<i>Aeromonas</i> spp. <i>B. thermosphacta</i> <i>Carnobacterium</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Leuconostoc</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Serratia</i> spp.	Bruckner et al. (2012) Mead (2004) Nieminen et al. (2012) Rouger et al. (2017) Rouger et al. (2018)

### 3.1.2.2 Kontaminationsquellen

Die heterogene Mikrobiota von Fleisch hat verschiedene Eintragsquellen. Vom Schlachttier selbst stammende Bakterien, wie beispielsweise Keime der Haut und des Gastrointestinaltrakts sowie der Umwelt, tragen zur Kontamination des Fleisches bei (Lambert

et al., 1991; Nychas et al., 2007). Weitere Kontaminationsquellen finden sich im Schlachtprozess und in der nachfolgenden Verarbeitung des Fleisches (Nychas et al., 2007).

Vom Tier ausgehende Kontaminationen sollen durch die Regelung in Verordnung (EG) Nr. 853/2004, Anhang III Abschnitt I Kapitel IV Nr. 4 reduziert werden. Laut dieser muss der Lebensmittelunternehmer sicher stellen, dass die zur Schlachtung vorgesehenen Tiere sauber sind. In Artikel 11 Nummer 4 der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 2019/627 wird darauf hingewiesen, dass bei der Schlachttieruntersuchung sicherzustellen ist, dass der Lebensmittelunternehmer diese Regelung erfüllt, um einer Kontamination des Fleisches während der Schlachtung vorzubeugen.

In Verordnung (EG) Nr. 853/2004, Anhang III Abschnitt I Kapitel IV Nr. 7 bis 9 finden sich weitere Regeln zur Vorbeugung von Kontaminationen, die während dem Schlachtprozess vom Tierkörper ausgehen: Die Schlachttierkörper, außer die von Schweinen sowie die Köpfe und Füße von Schafen, Ziegen und Kälbern, müssen enthäutet werden; die Schlachttierkörper von Schweinen müssen gebrüht und entborstet werden.

Ohne diese Maßnahme kann es zum Transfer von Schmutz, Haaren und Bakterien auf das Fleisch kommen (Grau, 1986). Bei Rindern gilt die Haut als eine wichtige Quelle für mikrobiologische Kontamination (Gill und Newton, 1978). Serraino et al. (2012) zeigen in einer Studie, dass ein höherer Verschmutzungsgrad der Tiere zu einer höheren bakteriellen Kontamination der Schlachttierkörper führt.

Kommt es im Laufe des Schlachtprozesses zu fäkalen Kontaminationen des Fleisches, müssen diese nach Verordnung (EG) Nr. 853/2004, Anhang III Abschnitt I Kapitel IV Nr. 10 unverzüglich weggeschnitten werden. Die Erfassung und Beseitigung sichtbarer Kontaminationen auf Schlachttierkörpern ist ein effektives Mittel ist, um die mikrobiologische Sicherheit von Fleisch zu gewähren (Gill, 2004).

Zudem zeigen Gill und Bryant (1993) in einer Studie, dass durch Darmentleerungen der Schlachttierkörper von Schweinen in Brüh- und Enthaarungsanlagen *E. coli* und *Campylobacter* spp. in die Maschinen und das Brühwasser gelangen können. Der bei diesem Prozess entstehende Detritus soll auch die Hauptkontaminationsquelle für Verderbserreger auf den gebrühten Schweineschlachtkörpern sein (Gill und Bryant, 1992).

Für den Schlachtprozess ist die Gute Hygienepraxis von großer Wichtigkeit, um Kontaminationen zu vermeiden. Vor allem die Enthäutung, das Ausweiden und die anschließende Zerlegung spielen dabei eine Rolle (Lambert et al., 1991). Jedoch kann es an jeder Stelle innerhalb der Schlachtkette zu Kreuzkontaminationen kommen (Petruzzelli et al., 2016). Diese Kreuzkontaminationen werden beeinflusst von der Struktur des Schlachtsystems, dem Schlachthofpersonal, der Geschwindigkeit des Schlachtbandes und dem Verschmutzungsstatus der Schlachttiere (Bacon et al., 2000; Blagojevic und Antic, 2014).

Die Ausarbeitung und Anwendung eines individuellen HACCP-Konzepts (hazard analysis and critical control points) ist nach Verordnung (EG) Nr. 853/2004 Kapitel II Artikel 5 für jeden Schlachthof vorgeschrieben. Um die Lebensmittelsicherheit und die Fleischqualität aufrecht zu erhalten, ist die Analyse des Schlachtprozesses anhand schlachthofspezifischer mikrobiologischer Überwachung gemäß dem HACCP-Konzept nötig (Zweifel et al., 2005). Blagojevic und Antic (2014) beschreiben in ihrer Arbeit allgemein gültige kritische Kontrollpunkte für die Vermeidung von mikrobiellen Kontaminationen am Schlachthof: Bei Enthäutung und Ausweiden darf es zu keiner sichtbaren Kontamination des Schlachttierkörpers kommen, die Brühtemperatur und -dauer darf nicht unterschritten werden, bei Wiederkäuern dürfen nach der Spaltung und Entfernung des Rückenmarks keine Rückstände davon auf den Schlachttierkörper gelangen und die an die Schlachtung anschließende Kühltemperatur darf nicht überschritten werden.

Neben den überwiegend vom Schlachttier stammenden Kontaminationen gehen weitere Kontaminationen des Fleisches aus der Umwelt und durch menschliche Kontaktpunkte mit der Weiterverarbeitung einher (Björkroth und Korkeala, 1997; Normanno et al., 2007). Die menschliche Haut beherbergt zahlreiche Mikroorganismen, die das Mikrobiom der Haut bilden und dem Schutz des Organismus gegen Umwelteinflüsse und Pathogene dienen (Byrd et al., 2018). Auch im menschlichen Magen-Darm-Trakt befindet sich eine hochkomplexe Mikrobiota (Xu und Knight, 2015). Durch Nichteinhalten der Guten Hygienepraxis (GHP) gelangen Keime der menschlichen Haut, des menschlichen Respirations- und Magen-Darm-Trakts während des Schlachtprozesses, der Zerlegung und des weiteren Warenverkehrs auf das Fleisch (Dainty und Mackey, 1992; Rho et al., 2001).

In der Luft befindliche Bakterien sind eine weitere Kontaminationsquelle für das Fleisch. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Kontaminationsniveau der Luft in verschiedenen Bereichen des Schlachthofs und den sich darin befindlichen Schlachttierkörpern (Rahkio und Korkeala, 1997). Rahkio und Korkeala (1997) zeigen in einer Studie außerdem, dass das Kontaminationslevel von Schlachttierkörpern in Schlachthöfen, in denen sich die Mitarbeiter zwischen verschiedenen Stationen entlang des Schlachtbands bewegen, höher ist als in Schlachthöfen, in denen keine derartige Bewegung stattfindet.

Einige Studien stellen zudem das Vorkommen von pathogenen Bakterien und Verderbserregern auf lebensmittelassoziierten Oberflächen und Gerätschaften von Fleischverarbeitungsbetrieben dar (Giaouris et al., 2014; Hultman et al., 2015; Nychas et al., 2008). Somit ist auch im Hinblick auf die Vermeidung von Kontaminationen aus der Umwelt eine gute Hygienepraxis unumgänglich.

### **3.1.2.3 Fleisch als Nährsubstrat für Bakterien**

Fleisch beinhaltet neben der Skelettmuskulatur anhaftendes oder integriertes Fett- und Bindegewebe sowie Blut-, Nerven- und Lymphgefäße. Es besteht aus den Hauptkomponenten Wasser, Protein und Fett, während Kohlenhydrate, Enzyme, Vitamine, Aromastoffe, Pigmente und lösliche Komponenten den kleinsten Anteil ausmachen (Lambert et al., 1991; Nychas et al., 2007). Aus Tabelle 2 lassen sich die durchschnittlichen prozentualen Anteile der Zusammensetzung eines Säugetiermuskels nach Nychas et al. (2007) entnehmen.

Aufgrund seines Reichtums an Nährstoffen ist Fleisch ein sehr verderbliches Lebensmittel (Ercolini et al., 2006). Die Konzentration bestimmter Nährstoffe wie Glucose, Milchsäure, Aminosäuren, Harnstoff, Nukleotide und wasserlösliche Proteine in Fleisch bestimmt die Geschwindigkeit des Verderbs (Koutsoumanis und Nychas, 1999; Nychas et al., 1998; Nychas et al., 2007; Tsigarida und Nychas, 2001).

Mit dem Tod der Schlachttiere wird die ATP-Synthese in den Zellen beendet. Aus der fortlaufenden Glykolyse reichert sich Laktat an, was eine Absenkung des pH-Wertes mit sich bringt. Somit ist der postmortale pH-Wert und der Gehalt an Glykogen im Fleisch abhängig von den ursprünglichen Glykogenreserven im Säugetiermuskel, welcher wiederum mit Tierart, Geschlecht, Alter und Ernährungszustand zusammenhängt. Der pH-Wert von magerem Fleisch

liegt durchschnittlich zwischen 5,5 bis 6,5, wobei pH-Werte über 6 auf stressinduzierten Glykogenabbau im noch lebenden Tier hinweisen können (Dainty und Mackey, 1992).

**Tabelle 2:** Durchschnittliche chemische Zusammensetzung eines Säugetiermuskels nach dem Rigor Mortis und vor der Zerlegung (nach Nychas et al., 2007)

Komponente	% Nassgewicht
Wasser	75,0
Protein	19,0
Myofibrillär	11,5
Sarkoplasmatisch	5,5
Fett	2,5
Kohlenhydrate und Laktat	1,2
Laktat	0,9
Glykogen	0,1
Lösliche Substanzen	2,3
Kreatin	0,55
Aminosäuren	0,35
Monophosphate	0,1
Anorganische Substanzen	0,65
Vitamine	Spuren

Die Verderbsmikrobiota nutzt hauptsächlich die niedermolekularen Substrate auf den ersten Millimetern der Fleischoberfläche, wie Glykogen, Glukose, Glukose-6-Phosphat, Aminosäuren, Peptide, Nukleotide und Kreatin (Dainty und Mackey, 1992; Gill, 1983; Gill und Newton, 1978). Diese bevorzugte Substrate werden im Lauf des bakteriellen Wachstums aufgebraucht, was einerseits einen Konzentrationsgradienten vom Inneren des Fleisches zur Oberfläche hervorruft (Gill, 1983), andererseits aber auch zum Verbrauch sekundärer Substrate führt (Gill, 1976).

Proteine und Lipide müssen zur Verwertung durch Bakterien mit Hilfe von Proteasen und Lipasen abgebaut werden, da sie nicht löslich und somit unbrauchbar für Bakterien sind (Gill, 1983). Bakterien, die die Fähigkeit haben, proteolytische Enzyme zu produzieren und damit die Fleischstruktur zu zerstören, produzieren diese Enzyme erst in der späten exponentiellen Wachstumsphase (Gill und Penney, 1977). Zu diesem Zeitpunkt hat der Verderbsprozess seinen Höhepunkt erreicht (Gill und Penney, 1977).

Auf fettreichen Geweben ist die bakterielle Wachstumsrate gleich hoch wie auf Muskelgewebe, jedoch sind auf Fett weniger Nährstoffe vorhanden. Diese werden schneller aufgebraucht und daraus folgt eine geringere Bakterienzahl (Gill, 1983; Gill und Newton, 1978). Zudem sind fettreiche Oberflächen von Schlachttierkörpern für bakterielles Wachstum

oftmals zu trocken, da sie dazu neigen, während der Kühlung Flüssigkeit zu verlieren (Gill, 1983). Dies resultiert wiederum in einer Senkung der Wasseraktivität, welche ein limitierender Faktor für das Bakterienwachstum darstellt (Scott, 1953).

### **3.1.3 Beeinflussende Faktoren**

Umweltfaktoren beeinflussen die Wachstumsrate, Stoffwechselaktivität und die natürliche Selektion der Mikrobiota auf Fleisch (Borch et al., 1996). Unterschiedliche Lagerungsbedingungen üben einen signifikanten Einfluss auf die Fleischmikrobiota und damit die Fleischqualität aus (Ercolini et al., 2011). Die Entwicklung der Verderbsmikrobiota wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, die nach Mossel (1971) in vier Gruppen eingeteilt werden:

- 1) Intrinsische Faktoren, die neben der chemischen Zusammensetzung auch die physikalischen Eigenschaften des Lebensmittels beinhalten.
- 2) Verarbeitung des Lebensmittels, wie zum Beispiel Erhitzen, Trocknen, Räuchern oder Säuern.
- 3) Extrinsische Faktoren, die von außen auf das Lebensmittel einwirken.
- 4) Implizite Faktoren, wie Wachstumsrate, Symbiosen und Antagonismus innerhalb der bakteriellen Mikrobiota.

#### **3.1.3.1 Intrinsische Faktoren**

Intrinsische Faktoren beinhalten die chemische Zusammensetzung und die physikalischen Eigenschaften des Lebensmittels (Mossel, 1971).

##### **3.1.3.1.1 pH-Wert**

Zum Zeitpunkt der Schlachtung beträgt der pH-Wert von Fleisch 7,0 bis 7,2 (Gill und Newton, 1978). Durch postmortale Glykolyse von Glykogen zu Milchsäure wird der pH-Wert von Fleisch auf 5,8 bis 5,4 gesenkt (Gill und Newton, 1978; Odeyemi et al., 2020). Kommt es prä mortal durch langanhaltenden Stress zum Glykogenabbau, steht postmortal weniger Glykogen zur Absenkung des pH-Wertes zur Verfügung, der pH-Wert bleibt über 6,0 und es entsteht DFD-Fleisch (dark, firm, dry) (Borch et al., 1996; Gill, 1983).

Zu PSE-Fleisch (pale, soft, exsudative) kommt es, wenn der Glykogenabbau unmittelbar vor



der Schlachtung durch akuten Stress beschleunigt abläuft und der pH-Wert des Fleisches postmortal unter 5,4 fällt (Gill und Newton, 1978).

Das Angebot schnell verfügbarer Nährstoffe für Bakterien, insbesondere Glukose, ist in Fleisch mit hohem pH-Wert ( $> 6,0$ ) und hohem Fettanteil verringert, was zu einem schnellen Abbau von Aminosäuren und letztendlich zu schnellerem Verderb führt (Borch et al., 1996).

Gill und Newton (1982) stellten in einer Studie dar, dass sich die Zusammensetzung der Mikrobiota auf Fleisch bei einem pH-Wert von 5,5 nicht signifikant von der Zusammensetzung bei einem pH-Wert von 6,0 unterscheidet. Faucitano et al. (2010) verglichen in einer Studie die Gesamtkeimzahl und die Anzahl präsumtiver Milchsäurebakterien auf Schweinefleisch unterschiedlicher Qualität, das 35 Tage lang bei 4 °C gelagert wurde. Sie fanden dabei heraus, dass auf DFD-Fleisch aufgrund des höheren pH-Wertes ( $> 6,0$ ) beide Keimzahlen signifikant höher waren als auf PSE-Fleisch (pH Wert  $< 5,4$ ) und Fleisch anderer Qualität (Faucitano et al., 2010).

In der Studie von Blixt und Borch (2002) wurde die Haltbarkeit von vakuumverpacktem Schweinefleisch und Rindfleisch mit anfänglich hohem pH-Wert ( $\geq 5,6$ ) verglichen mit der Haltbarkeit von Schweine- und Rindfleisch mit niedrigerem pH-Wert ( $\leq 4,5$ ). Nach drei bis vier Wochen bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C wurden dabei die Höchstwerte an Milchsäurebakterien und an *Pseudomonas* spp. auf dem Fleisch mit anfänglich höherem pH-Wert erreicht, während auf dem Fleisch mit anfänglich niedrigerem pH-Wert nach sechs bis acht Wochen dieselbe Keimzahl erreicht wurde. Ein niedrigerer Fleisch pH-Wert wirkt sich demnach positiv auf die Haltbarkeit des Fleisches aus, wobei anzumerken ist, dass PSE-Fleisch nicht von guter Fleischqualität ist.

**Tabelle 3:** pH-Werte für das Wachstum ausgewählter Verderbserreger und *S. aureus*

Mikroorganismus	pH-Wert	Literatur
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	7,0 (Optimum)	Leroi et al. (2012)
	4,8 (Minimum)	
<i>Pseudomonas fragi</i>	7,0 (Optimum)	Lebert et al. (1998)
	5,5 (Minimum)	
<i>Serratia proteamaculans</i>	5,0 - 9,0 (Wachstumsbereich)	Raffi (2014)
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0 – 10,0 (Wachstumsbereich)	Schelin et al. (2011)

#### 3.1.3.1.2 $a_w$ -Wert

Der Begriff der Wasseraktivität ( $a_w$ ) wurde durch Scott im Jahr 1953 eingeführt (Leistner und Rödel, 1975) und ist das Maß für frei verfügbares Wasser in Lebensmitteln (Rödel, 1993). Scott (1953) zeigte, dass das Wachstum von *Staphylococcus* (*S.*) *aureus*-Isolaten trotz ausreichendem Nährstoffangebot durch abnehmende Wasseraktivität sinkt und die Wasseraktivität somit einen limitierenden Faktor bezüglich bakterieller Stoffwechsellleistungen darstellt. Für Wachstum und Stoffwechselaktivität von Bakterien ist Wasser essentiell, jedoch ist nicht all das im Lebensmittel vorhandene Wasser frei für sie verfügbar (Rödel, 1993). Durch Bindung des Wassers in Zellen oder an Salzionen steht ein Teil davon nicht für bakterielle Nutzung zur Verfügung. Wachstum, Überlebensfähigkeit und metabolische Aktivität von Mikroorganismen hängen daher von der Wasseraktivität im Lebensmittel ab (Leistner und Rödel, 1975).

Frisches Fleisch hat einen  $a_w$ -Wert von 0,99, der während der Kühlung auf 0,96 - 0,97 sinkt (EFSA, 2016). Dabei verdunstet das Wasser der Fleischoberfläche und wird von dem darunter liegenden Gewebe nicht ausreichend durch Diffusion ersetzt (Gill und Newton, 1978). Bakterielleres Wachstum auf der Fleischoberfläche wird durch die reduzierte Wasseraktivität gehemmt, während Hefen und Schimmelpilze unter den herrschenden Bedingungen weiterwachsen (Gill und Newton, 1978).

Die Haltbarkeit von Lebensmitteln mit hoher Wasseraktivität wird durch mikrobiologische Aktivität begrenzt (Rödel, 1993). Durch Absenkung des  $a_w$ -Wertes wird folglich die Sicherheit und Stabilität erhöht (Leistner, 1992).

Schon eine geringe Änderung des  $a_w$ -Wertes hat Einfluss auf das bakterielle Wachstum; so wachsen *B. thermosphacta* und *Lactobacillus* spp. bei niedrigeren  $a_w$ -Werten von 0,93 bis 0,94 als *Pseudomonas*, die bei 0,95 bis 0,96 wachsen (Leistner und Rödel, 1975). Das Keimwachstum von *S. aureus* ist bei  $a_w$ -Werten zwischen 0,99 bis 0,86 zu verzeichnen, während die Wachstumsrate und die Keimzahl ab einem  $a_w$ -Wert von  $< 0,94$  erheblich abnimmt (Scott 1953).

Für die Konservierung von Lebensmitteln durch Senkung des  $a_w$ -Werts werden verschiedene Methoden angewandt, wie beispielsweise die Zugabe von Salz oder Zucker, Trocknen oder Gefriertrocknen. Die gängigste Methode, um die Wasseraktivität in Fleischprodukten zu senken und somit einen antimikrobiellen Effekt zu erzielen, ist die Zugabe von Salz (Mariutti und Bragagnolo, 2017). Werden 4 % Salz zu Fleischprodukten hinzugegeben, wird deren Wasseraktivität von 0,99 auf 0,97 reduziert. Dies schränkt das Wachstum von *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas* ein, während Milchsäurebakterien und Hefen weiterhin wachsen (Blickstad und Molin, 1983b). Bei Reduzierung der Wasseraktivität in Würsten von 0,98 auf 0,96 wird die lag-Phase von Milchsäurebakterien in ihrer Zeit verdreifacht und deren Wachstumsrate halbiert (Borch et al. , 1996).

**Tabelle 4:** Minimaler  $a_w$ -Wert für das Wachstum ausgewählter Verderbserreger und *S. aureus*

Mikroorganismus	Minimaler $a_w$ -Wert	Literatur
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	0,93	(Leistner und Rödel, 1975)
<i>Pseudomonas fragi</i>	0,97	Lebert et al. (1998) Singh und Anderson (2004)
<i>Serratia proteamaculans</i>	0,91	Rafii (2014)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86	Scott (1953)

### 3.1.3.1.3 Nährstoffangebot

Fleisch ist aufgrund seines Reichtums an Nährstoffen ein sehr verderbliches Lebensmittel (Ercolini et al., 2006). Beim Fleischverderb führt der bakterielle Abbau von Nährstoffen zu flüchtigen organischen Verbindungen (Casaburi et al., 2015; Ercolini et al., 2009). Die von der Verderbsmikrobiota gebildeten flüchtigen organischen Verbindungen umfassen Ketone, Alkohole, Aldehyde, Fettsäuren, Esther und Schwefelverbindungen (Casaburi et al., 2015; Dainty et al., 1985; La Storia et al., 2012). Sie führen zum organoleptischen Verderb des Fleisches (Ercolini et al., 2006). Das Verderbspotential eines Verderbserregers kann demnach anhand seines Vermögens, verderbsassoziierte Metabolite zu bilden, bestimmt werden (Casaburi et al., 2015).

Die bevorzugten Substrate der Fleischmikrobiota sind lösliche Stoffe mit niedrigem Molekulargewicht (Gill, 1983). Einfache Zucker wie Glukose, gefolgt von Glucose-6-Phosphat, werden unter aeroben Bedingungen hauptsächlich von *Pseudomonas* spp. zuerst verstoffwechselt (Carrizosa et al., 2017; Gill und Newton, 1977). Auch *B. thermosphacta* bevorzugt Glukose, hat jedoch durch sein langsames Wachstum Nachteile gegenüber *Pseudomonas* spp. (Carrizosa et al., 2017).

Bei limitiertem Zuckerangebot wechseln einige Bakterien von saccharolytischem zu Aminosäure-abbauendem Stoffwechsel (Nychas et al., 2008). Ab einer Keimzahl von  $10^8$  KbE/g Fleisch wurde die Bildung von Ammoniak detektiert, genauso wie eine Abnahme an Kohlehydraten, Nucleotiden und freien Aminosäuren (Gardner und Stewart, 1966a; Gill und Newton, 1977; Ingram und Dainty, 1971). Jedoch wurde in einer anderen Studie die Zunahme an freien Aminosäuren gezeigt (Gardner und Stewart, 1966b). Auch Carrizosa et al. (2017) beschrieben den Beginn der Aminosäureverwertung ab einer Keimzahl von  $10^8$  KbE/g mit einhergehender Fäulnis.

Auf fettreichen Oberflächen trocknet Fleisch schnell aus und ist demnach oftmals zu trocken, um bakterielles Wachstum zu begünstigen (Gill, 1983). Zudem ist das Nährstoffangebot auf Fettgewebe gering und die Diffusion von Nährstoffen verlangsamt, was in einer geringeren bakteriellen Wachstumsrate resultiert (Gill, 1983).

### 3.1.3.2 Extrinsische Faktoren

Parameter der Lagerungsumgebung des Lebensmittels werden unter dem Begriff „Extrinsische Faktoren“ zusammengefasst (Bruckner et al., 2012a).

#### 3.1.3.2.1 Temperatur

Die Lagerungstemperatur wird als Hauptfaktor für den Verderb und die Sicherheit von Fleisch angesehen (Koutsoumanis und Taoukis, 2005). Sowohl die Zusammensetzung der Mikrobiota von Fleisch als auch das bakterielle Wachstum wird durch die Temperatur beeinflusst (Borch et al., 1996). Auch beeinflusst die Lagerungstemperatur das Verderbspotential verschiedener Bakterien (Stanbridge und Davies, 1998).

Das Wachstum von sowohl Gram-positiven Verderbserregern wie zum Beispiel Milchsäurebakterien, als auch von Gram-negativen Verderbserregern, wie *Pseudomonas* spp. oder von psychrotoleranten Pathogenen, wird durch Kühlung begünstigt (Gill und Newton, 1978; Labuza und Fu, 1993). Mesophile Lebensmittelinfektionserreger wie beispielsweise *S. aureus* oder *Bacillus cereus* wachsen dagegen bei höheren Lagerungstemperaturen (Labuza und Fu, 1993).

Das Wachstum von *Enterobacteriaceae* wird bei -1,5 °C reduziert, während eine Erhöhung der Temperatur auf 4 °C das Bakterienwachstum wieder initiiert (Borch et al., 1996). Auch McMullen und Stile (1994) zeigen in einer Studie, dass die Zusammensetzung der Fleischmikrobiota von der Temperatur beeinflusst wird. So waren *Carnobacterium* spp. die dominante Spezies in Schweinefleisch, gelagert bei -1,5 °C, während *Lactobacillus* spp. bei 4 °C und 7 °C dominierten.

**Tabelle 5:** Optimale Wachstumstemperatur ausgewählter lebensmittelassoziierter Verderbserreger und *Staphylococcus aureus*

Mikroorganismus	Temperatur °C	Literatur
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	21	Sneath und Jones, 1976
<i>Pseudomonas fragi</i>	26	DSMZ (2021)
<i>Serratia proteamaculans</i>	30	DSMZ (2021)
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	Medved'ová und Valík (2012)

### 3.1.3.2.2 Atmosphäre

Ein weiterer Parameter ist die Atmosphäre, in der das Fleisch verpackt ist. Die Sauerstoffverfügbarkeit beeinflusst neben der Lagerungstemperatur die Anzahl und Art der Bakterien, die auf Fleisch dominieren (Labadie, 1999).

Rindfleisch wird im Allgemeinen vakuumverpackt oder in modifizierter Atmosphäre (MA) gelagert, während Schweinefleisch bei aerober oder modifizierter Atmosphäre gelagert wird (Borch et al., 1996). In folgender Reihenfolge nimmt die Haltbarkeit von Fleisch in verschiedenen Atmosphären zu: Luft, MA mit hohem Sauerstoff (O<sub>2</sub>) Anteil, Vakuum, MA ohne O<sub>2</sub> und 100 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) (Borch et al., 1996). Kommen zur CO<sub>2</sub>-Atmosphäre ein (O<sub>2</sub>) oder zwei (O<sub>2</sub>, Stickstoff (N<sub>2</sub>)) weitere Gase dazu, verkürzt sich die Haltbarkeit von Fleisch (Labadie, 1999).

#### **Aerobe Atmosphäre**

Wird Fleisch in aerober Atmosphäre gelagert, dominiert eine psychrotrophe Gram-negative Mikrobiota (Dainty und Mackey, 1992), wobei *Pseudomonas* spp. die Hauptvertreter sind und schnell die Fleischmikrobiota beherrschen (Gill, 1983; Jay et al., 2003; Koutsoumanis et al., 2006; Labadie, 1999; McMeekin, 1975; Stanbridge und Davies, 1998). *Pseudomonas (P.) fragi* stellt dabei die dominante Spezies auf kühl gelagertem Fleisch unter aeroben Bedingungen dar, was an dessen Vermögen, Kreatin, Kreatinin und aminosäureartige Substrate zu verstoffwechseln, liegt (Drosinos und Board, 1994). Auch Vertreter der *Enterobacteriaceae*, wie *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei* und *Serratia liquefaciens*, kommen auf aerob gelagertem Fleisch vor (Dainty und Mackey, 1992; Nychas et al., 2008).

Ercolini et al. (2006) beschrieben das Vorkommen von *Rhanelia aquatis* und anderen *Rhanelia* spp., *Pseudomonas* spp. und *Carnobacterium divergens* auf Rindfleisch, das unter aerober Atmosphäre gelagert wird. Die Gattung *Acinetobacter* wird von Gill (1983) neben *Pseudomonas* spp. als wichtiger Verderbserreger unter aerober Atmosphäre genannt. *B. thermosphacta* ist ein weiterer Vertreter, der hauptsächlich auf aerob gelagertem Schweine- und Lammfleisch auftritt und einen geringeren Anteil an der Verderbsmikrobiota ausmacht (Blickstad, 1983; Dainty und Mackey, 1992). Auch auf aerob gelagertem Rindfleisch wurde *B. thermosphacta* nachgewiesen (Erichsen und Molin, 1981).

Ercolini et al. (2011) zeigten, dass *B. thermosphacta* in aerob bei 4 °C gelagertem Rindfleisch

in der frühen Phase der Lagerung dominiert und anschließend von *Pseudomonas* spp. überlagert wird.

Auch das Vorkommen von LAB unter aeroben Bedingungen ist beschrieben, jedoch werden sie nicht zu den Hauptakteuren des Verderbsprozesses unter aeroben Bedingungen gezählt (Borch et al., 1996; Holzapfel, 1998).

### **Modifizierte Atmosphäre**

Um die Haltbarkeit von Fleisch zu erhöhen, wird CO<sub>2</sub> als haltbarmachendes Gas in verschiedenen Anteilen eingesetzt und somit eine modifizierte Atmosphäre (MA) erzeugt. Gleichzeitig werden Produkte in MA bei Kühltemperaturen gelagert. Zudem wird bei der Verpackung Material verwendet, das den Austausch von Gasen zwischen der Verpackung und der umgebenden Atmosphäre verhindert (Gill, 2003).

Eine Mischung von 20 - 40 % CO<sub>2</sub> mit 60 - 80 % O<sub>2</sub> ist die am meisten verwendete Kombination im Handel (Dainty und Mackey, 1992). CO<sub>2</sub> inhibiert und verlangsamt das Wachstum Gram-negativer Verderbserreger wie *Pseudomonas* spp. und *Enterobacteriaceae*, indem die lag-Phase und die Generationszeit verlängert wird und Substrate verlangsamt aufgenommen werden (Jeremiah, 2001; Singh et al., 2011). O<sub>2</sub> erhält die rote Farbe des Fleisches (Dainty und Mackey, 1992; Gill, 2003). Auch verlängert die Verpackung in MA die Haltbarkeitsdauer, reduziert ökonomische Einbußen und erhält die Qualität des Produktes (Farber, 1991).

In MA verändert sich die Fleischmikrobiota im Vergleich zur Lagerung unter aeroben Bedingungen. Der erhöhte CO<sub>2</sub>-Gehalt ermöglicht es LAB wie *Leuconostoc* spp. und *Lactobacillus* spp. zu wachsen; folglich werden aerobe Verderbserreger wie *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* und *Enterobacteriaceae* verdrängt (Gill, 2003). Innerhalb der LAB variieren die dominierenden Spezies je nach CO<sub>2</sub> Gehalt (Nieminen et al., 2015). So begünstigt eine hohe CO<sub>2</sub>-Konzentration das Wachstum von *Lactobacillus* spp., eine hohe O<sub>2</sub>-Konzentration *Leuconostoc* spp. und MA mit 80 % N<sub>2</sub> und 20 % CO<sub>2</sub> *Lactococcus* spp. (Nieminen et al., 2015)

Auf Rindfleischsteaks dominieren nach 14 Tagen Lagerung in 75 % O<sub>2</sub> und 25 % CO<sub>2</sub> *Leuconostoc* spp., nachdem die initiale Mikrobiota von *Micrococcus* spp., *Moraxella* spp. und *Acinetobacter* spp. beherrscht wurde (Hanna et al., 1981). Ercolini et al. (2006) fanden *Lactobacillus sakei* und *Pseudomonas* spp. auf Rindfleisch, das 14 Tage bei 5 °C in MA mit 60 % O<sub>2</sub> und 40 % CO<sub>2</sub> gelagert wurde; *Rhanella* spp. und *Lactobacillus sakei* waren die

Hauptvertreter in MA mit 20 % O<sub>2</sub> und 40 % CO<sub>2</sub>. Gleichzeitig wurden auf bei 5 °C aerob gelagertem Rindfleisch *Carnobacterium divergens*, *Pseudomonas* spp. und *Rhanella* spp. nachgewiesen.

Carrizosa et al. (2017) untersuchten in ihrer Studie frisches Ziegenfleisch, das 14 Tage bei 10 °C in zwei unterschiedlichen MA gelagert wurde. Bei Ziegenfleisch in MA mit 20 % O<sub>2</sub>, 45 % CO<sub>2</sub> und 35 % N<sub>2</sub> war *Hafnia alvei* die dominante Spezies, während bei dem Fleisch in MA mit 55 % O<sub>2</sub>, 20 % CO<sub>2</sub> und 25 % N<sub>2</sub> *Serratia proteamaculans* dominierte. Außerdem führte eine Lagerung in MA mit 20 % O<sub>2</sub>, 45 % CO<sub>2</sub> und 35 % N<sub>2</sub> zu signifikant niedrigerer aerober mesophiler Keimzahl und niedrigerer Anzahl an *B. thermosphacta* und *P. fragi* im Vergleich zu der MA mit niedrigerem CO<sub>2</sub> Gehalt.

In der Studie von Höll et al. (2016) wurde die Verderbsmikrobiota von Hühnerbrust in MA mit hohem O<sub>2</sub> Gehalt (80 % O<sub>2</sub> und 20 % CO<sub>2</sub>) und mit niedrigem O<sub>2</sub> Gehalt (65 % N<sub>2</sub> und 35 % CO<sub>2</sub>) verglichen. Dabei wurde das Hühnerfleisch bei zwei Temperaturansätzen, 4 °C und 10 °C, gelagert. Die Ergebnisse der Studie zeigten das Vorkommen von *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* und *Carnobacterium* spp. in MA mit hohem O<sub>2</sub> Gehalt bei sowohl 4 °C als auch bei 10 °C Lagertemperatur. In MA mit niedrigem O<sub>2</sub> Gehalt war *Hafnia alvei* der Hauptvertreter; bei 10 °C wurden *Carnobacterium* spp., *Yersinia* spp. und *Serratia* spp. nachgewiesen. Die Autoren schlugen aufgrund des Vorkommens pathogener Keime wie *Yersinia* spp. die MA mit hohem O<sub>2</sub> Gehalt als günstigere Gasatmosphäre für Hühnerfleisch vor.

In einer Studie von Jääskeläinen et al. (2016) wurde Rindfleisch unter anderem in MA mit hohem O<sub>2</sub> Gehalt von 80 % untersucht. Nach zwei Wochen Lagerung dominierte *Leuconostoc* und das Fleisch wurde mittels sensorischer Evaluierung als zehn Tage früher verdorben wahrgenommen als vergleichbares Rindfleisch in Vakuumverpackung.

In einer anderen Studie, in der Rindfleisch in MA mit 60 % O<sub>2</sub> und 40 % CO<sub>2</sub> gelagert wurde, konnte ein Shift von anfänglich dominierenden *B. thermosphacta* zu *Pseudomonas* spp. nach 14 Tagen Lagerung beobachtet werden (Ercolini et al., 2011). Nach weiteren sieben Tagen Lagerung wurde zusätzlich *Carnobacterium divergens* nachgewiesen.



## Vakuum

In einer Vakuumverpackung nimmt das vorhandene O<sub>2</sub> ab, während CO<sub>2</sub> zunimmt. Die Fleischmikrobiota verschiebt sich dabei zugunsten von CO<sub>2</sub>-toleranten, langsam wachsenden Bakterien (Borch et al., 1996; Ingram und Dainty, 1971). Milchsäurebakterien dominieren die Mikrobiota, darunter vor allem *Carnobacterium* spp., *Leuconostoc* spp. und *Lactobacillus* spp. (Borch und Molin, 1988; Shaw und Harding, 1984).

Erichsen und Molin (1981) fanden in einer Studie heraus, dass sich die Vakuumierung von Rindfleisch im Vergleich zur Verpackung in MA mit 20 % CO<sub>2</sub>, beides bei 4 °C, als effizienter herausstellt. Die längste Haltbarkeit von Rindfleisch bei 4 °C wird jedoch in einer Atmosphäre mit 100 % CO<sub>2</sub> erreicht. Auch hier dominierten Milchsäurebakterien unter Vakuumverpackung. *B. thermosphacta* wurde in vakuumverpacktem Rindfleisch bei 4 °C Lagerungstemperatur mit einem pH-Wert von 6,6 zusätzlich nachgewiesen. Bei höheren Temperaturen können auch Vertreter der *Enterobacteriaceae* die Mikrobiota dominieren (Gill und Newton, 1980).

Ercolini et al. (2011) beobachteten eine verlängerte lag-Phase des bakteriellen Wachstums unter Vakuum und beschrieben *Carnobacterium divergens* als Hauptvertreter auf vakuumverpacktem Rindfleisch, das 21 Tage bei 4 °C gelagert wurde. Auch *Pantoea* spp., *Serratia liquefaciens* und *Pseudomonas* spp. wurden darauf nachgewiesen.

Pennacchia et al. (2011) verglichen die Verderbsmikrobiota zwischen aerob und unter Vakuum gelagertem Rindfleisch bei 4 °C. Dabei wurde unter Vakuum ein geringerer Keimgehalt an *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. und *B. thermosphacta* beobachtet, während das Wachstum von LAB nicht beeinflusst wurde. Auch *Photobacterium* spp. wurden unter beiden Lagerungsbedingungen nachgewiesen. Die Gesamtkeimzahl wurde unter Vakuum im Vergleich zur aeroben Lagerung beeinflusst, jedoch nicht die Speziesdiversität.

Im Vergleich zur Vakuumverpackung, in der die Keimselektion allmählich vonstatten geht, erfolgt die Selektion unter 100 % CO<sub>2</sub> sofort (Blickstad, 1983). LAB wachsen unter 100 % CO<sub>2</sub> langsamer, und im Vergleich zur aeroben Lagerung dauert es bei 4 °C 30 Tage länger, um Verderbsgeruch und Keimzahlen von 10<sup>7</sup> KBE/cm<sup>2</sup> bei Schweinefleisch zu erreichen (Blickstad, 1983).

Psychrophile und psychrotolerante *Clostridium* (*Clos.*) spp. spielen eine bedeutende Rolle im Verderb von vakuumverpacktem Fleisch. Psychrophile Clostridien besitzen die Fähigkeit, in vakuumverpacktem Fleisch bei Temperaturen zwischen -1,5 °C und 15 °C zu wachsen (Bonke et al., 2016).

Zu den Verderbserregern unter psychrophilen Clostridien gehören *Clos. algidicarnis*, *Clos. frigidicarnis*, *Clos. bowmanii*, *Clos. ruminantium*, *Clos. algidixylanolyticum* und *Clos. frigoris* (Adam et al. 2010; Broda et al., 1999, 2000a, 2000b; Cavill et al. 2011).

*Clos. estertheticum* und *Clos. gasigenes* sind die Hauptverursacher des sogenannten „blown pack spoilage“ (BPS) von vakuumverpacktem Fleisch (Dorn-In et al. 2018). Zudem wurden *Clos. frigorophilum* und *Clos. tagluense*-like Gruppe II als Verursacher von BPS bei Rindfleisch beschrieben (Dorn-In et al., 2018). BPS ist das Resultat bakterieller Gasproduktion, welche zur Ausdehnung der Verpackung führt (Bonke et al., 2016). Rohes und gekochtes Rind-, Lamm- und Rehfleisch können von BPS betroffen sein (Bonke et al., 2016, Broda et al., 1996; Dorn-In et al., 2018).

Der Fleischverderb durch Clostridien zeichnet sich durch reichliche Exsudatproduktion, Weichwerden des Fleisches, Gasbildung und käsige oder schwefelige Geruchsabweichungen aus (Brightwell und Clemens, 2012).

Bisher werden keine Gesundheitsrisiken mit kältetoleranten Clostridien in Verbindung gerichtet, jedoch verursacht der Fleischverderb durch Clostridien schwere finanzielle Einbußen für die Fleischindustrie.

## 3.2 Verderbserreger

### 3.2.1 Übersicht

Jedes Lebensmittel beinhaltet eine charakteristische und spezifische Mikrobiota, abhängig von dem rohen Ausgangsmaterial, der Haltbarmachung, der Verarbeitung und den Lagerungskonditionen (Gram et al., 2002). Zum Zeitpunkt des Verderbs besteht die Mikrobiota aus den sogenannten „specific spoilage organism(s)“ (SSO) des Lebensmittels (Gram et al., 2002). Der Begriff der SSO wurde ursprünglich eingeführt, um eine Spezies zu definieren, die für den Verderb verantwortlich ist (Casaburi et al., 2015). Jedoch deckt der Begriff SSO vielmehr eine Gruppe verschiedener Mikroorganismen ab, die durch Interaktion zum Verderb eines bestimmten Produktes beitragen (Gram et al., 2002; Huis in't Veld, 1996; Nychas et al.,

2008).

Durch die Kenntnis der SSO eines Lebensmittels, deren Keimdynamik und der jeweiligen Umweltbedingungen kann die Haltbarkeit des Lebensmittels modellhaft vorausgesagt werden (Dalgaard, 1995; Koutsoumanis und Nychas, 2000).

Sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien sind am Verderbsprozess von Fleisch beteiligt. Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae*, der Gattung *Pseudomonas*, der Ordnung Lactobacillales und die Spezies *B. thermosphacta* zählen zu den wichtigsten Vertretern (Borch et al., 1996; Casaburi et al., 2015; Doulgeraki et al., 2012; Gill und Newton, 1978; Labadie, 1999; Nychas et al., 2008; Pennacchia et al., 2011).

### 3.2.2 Ausgewählte Verderbserreger

Die Verderbserreger von Fleisch bilden einen komplexen Themenbereich. Je nach Tierart, intrinsischen und extrinsischen Faktoren variiert die vorherrschende Verderbsmikrobiota (Ercolini et al., 2011; Johanson et al., 1983, Mossel, 1971). In dieser Studie wurde Augenmerk auf den aeroben Verderb von Schweinefleisch gelegt und die darauf am häufigsten vorkommenden Bakterien *Pseudomonas*, *B. thermosphacta*, *Enterobacteriaceae* und *Staphylococcus* (Labadie, 1999; Blickstad und Molin, 1983a) untersucht. Diese Erreger werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

#### 3.2.2.1 *Brochothrix thermosphacta*

*B. thermosphacta* wurde erstmals von Mc Lean und Sulzbacher (1953) als *Microbacterium thermosphactum* beschrieben, nachdem es wiederholt von frischer Wurst aus Schweinefleisch isoliert wurde (Mc Lean und Sulzbacher, 1953). Das mit dem Genus *Listeria* eng verwandte Bakterium ist ein wichtiger Verderbserreger von Fleisch und Fleischprodukten (Collins et al., 1991; Gribble und Brightwell, 2013). Innerhalb des Genus *Brochothrix* gibt es zwei Spezies: *B. thermosphacta* und *B. campestris* (Talon et al., 1988). Die unbeweglichen, fermentativen und Katalase-positiven Stäbchen sind Gram-positiv, jedoch verlieren manche Zellen die Fähigkeit, die Gram-Färbung zu erhalten (Sneath und Jones, 1976). Die Unfähigkeit, Sporen zu bilden und die Unfähigkeit zur Hämolyse sind weitere Eigenschaften des fakultativ anaeroben Bakteriums (Sneath und Jones, 1976).

Charakteristisch für *B. thermosphacta* sind verschiedene morphologische Erscheinungsformen innerhalb unterschiedlicher Wachstumsphasen: Neu kultiviert bilden sich zunächst kokkoide Formen und Stäbchen, während der lag-Phase nehmen die Stäbchen dann an Länge zu (Rattanasomboon et al., 1999). Gram-Färbungen von Kulturen in der exponentiellen Phase zeigen einzelne Stäbchen oder kurze Ketten sowie lange, geknickte Ketten, die durch Kurven- und Schleifenbildung charakteristisch verknottete Massen darstellen (Sneath und Jones, 1976). Während der stationären Phase kommen neben vereinzelt oder paarweise gelagerten Keimen auch kokkoide Formen vor, die sich durch Subkultivierung zur Stäbchenform entwickeln (Davidson und Hartree, 1968; Rattanasomboon et al., 1999).

Der optimale pH-Wert für das Wachstum von *B. thermosphacta* liegt bei 7,0; das pH-Wert-Minimum bei 4,8 (Leroi et al., 2012). Die Temperatur für das Wachstumsoptimum von *B. thermosphacta* liegt zwischen 20 und 22 °C, jedoch ist Wachstum auch bei Kühlhaustemperaturen von 3 °C möglich (Gill und Harrison, 1989; Sneath und Jones, 1976). Dies ermöglicht das Wachstum auf gekühltem Fleisch und ist somit ausschlaggebend für das Vorkommen von *B. thermosphacta* auf Fleisch und Fleischprodukten (Borch et al., 1996; Gribble und Brightwell, 2013).

Neben dessen Isolierung aus Tieren und Produkten tierischer Herkunft wurde *B. thermosphacta* auch von Tischen und Ausrüstungsgegenständen fleischverarbeitender Betriebe isoliert (Nychas et al., 2008).

### **Lebensmittelrelevanz**

*B. thermosphacta* wird hauptsächlich mit dem Verderb frischen Fleisches in Verbindung gebracht (Ercolini et al., 2006; Pennacchia et al., 2009; Rattanasomboon et al., 1999; Russo et al., 2006). Die Fähigkeit, sowohl unter aeroben Konditionen, als auch in Vakuumverpackung und modifizierten Atmosphären zu wachsen, macht *B. thermosphacta* zu einem wichtigen Teil der Verderbsmikrobiota und bei hohem O<sub>2</sub>-Gehalt gelegentlich neben Pseudomonaden zum vorherrschenden Verderbserreger (Borch et al., 1996; Ercolini et al., 2006; Gribble und Brightwell, 2013; Labadie, 1999; Pennacchia et al., 2011; Pin et al., 2002).

Jedoch wird *B. thermosphacta* mit abnehmendem O<sub>2</sub>-Gehalt von Milchsäurebakterien durch den abfallenden pH-Wert und die Konkurrenz um Nährstoffe zunehmend verdrängt (Russo et al., 2006; Sakala et al., 2002). Beim Fleischverderb werden Gasproduktion, käsige und

unangenehme Geruchsabweichungen, Farbveränderungen des Fleisches und leicht grünliche Verfärbung des Tropfsaftes mit *B. thermosphacta* assoziiert (Casaburi et al., 2015; Gribble et al., 2014; McClure et al., 1993; Russo et al., 2006).

### 3.2.2.2 *Enterobacteriaceae*

Die Familie der *Enterobacteriaceae* beinhaltet sowohl pathogene Keime als auch nicht pathogene oder fakultativ pathogene Kommensalen (Schierack et al., 2007). Viele Genera dieser Familie sind Teil der Darm-Mikrobiota von Säugetieren (Stecher et al., 2012). Zudem spielen einige Genera eine Rolle als Verderbserreger von Fleisch (Dainty und Mackey, 1992).

*Enterobacteriaceae* sind Gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchen, die keine Sporen bilden (Ewing et al., 1980). Durch peritriche Flagellen sind einige Vertreter der Enterobakterien beweglich (z.B. *Proteus*); andere sind unbeweglich (z.B. *Klebsiella*) (Ewing et al., 1980; Guentzel, 1996). Sie haben die Fähigkeit, Kohlehydrate und Polyhydroxylalkohole zu Säuren und Gasen zu fermentieren (Ewing et al., 1980).

### Lebensmittelrelevanz

*Enterobacteriaceae* werden neben Ihrer Rolle als Teil der Fleischmikrobiota auch als Indikatorbakterien betrachtet (Nychas et al., 1998; Ojer-Usoz et al., 2013). In der Verordnung (EU) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien werden für Fleisch und Fleischerzeugnisse *Salmonella*, *E. coli* und *Enterobacter sakazakii* als Lebensmittelsicherheitskriterien aufgeführt, während die Familie *Enterobacteriaceae*, das Genus *Salmonella* und die Spezies *E. coli* als Prozesshygienekriterien aufgelistet sind. Ihre Bedeutung als Indikatoren besteht darin, dass sie als Marker für fäkale Kontaminationen sowohl in der Umgebung als auch auf Schlachttierkörpern zu finden sind (Ghafir et al., 2008) und somit Rückschlüsse auf hygienisches Arbeiten geben können.

Neben nicht-pathogenen Vertretern können Lebensmittel pathogene *Enterobacteriaceae*, wie *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. oder *E. coli* O157:H7 aufweisen, deren Verzehr zu lebensmittel-assoziierten Erkrankungen führen kann (Ackers et al., 1998; Bhaduri, 2003; Callejón et al., 2015; Newell et al., 2010; Wang et al., 2007).

Die Genera *Klebsiella*, *Proteus*, *Hafnia*, *Serratia*, *Enterobacter* und *Pantoea* gelten als Verderbserreger innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* (Borch et al., 1996; Kameník,

2013), wobei *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens* und *Pantoea agglomerans* das höchste Verderbspotential besitzen (Samelis, 2006). Das am häufigsten auf Fleisch zu findende Genus ist *Serratia* (Doulgeraki et al., 2012), wovon *Serratia proteamaculans* und *Serratia liquefaciens* auf frischem Fleisch vorkommen (Doulgeraki et al., 2011). Auf gekühltem, aerob gelagertem Fleisch sind meist kältetolerante Enterobakterien, wie *Serratia liquefaciens*, *Pantoea agglomerans* und *Hafnia alvei* in verhältnismäßig geringerer Zahl im Vergleich zu anderen Verderbserregern vorhanden (Nychas et al., 2008). Dennoch stellen *Enterobacteriaceae* eine nicht zu vernachlässigende Komponente der Verderbsmikrobiota von Fleisch dar, wie zahlreiche Studien belegen (Ercolini et al., 2006; Li et al., 2014; Pennacchia et al., 2011; Seydim et al., 2006).

Auf Fleisch, das unter MA mit hohem CO<sub>2</sub>-Gehalt verpackt wurde, besteht der Hauptanteil der Verderbsmikrobiota aus *B. thermosphacta* und Milchsäurebakterien, jedoch tragen auch die *Enterobacteriaceae* in geringerem Anteil zum Fleischverderb bei (Säde et al., 2013). Die Gaskomposition in MA-Verpackungen von Fleisch beeinflusst die Zusammensetzung der *Enterobacteriaceae* (Säde et al., 2013). *Serratia liquefaciens* ist dabei der am häufigsten vorkommende Vertreter in unterschiedlichsten Gasatmosphären (Doulgeraki et al., 2011; Lee et al., 1985).

*Hafnia alvei* wurde mehrfach in Fleisch unter MA-Verpackung oder Vakuumverpackung nachgewiesen (Borch et al., 1996; Carrizosa et al., 2017; Doulgeraki et al., 2011; Lee et al., 1985). In einer Studie von Doulgeraki et al. (2011) wurde *Proteus vulgaris* auf Rinderhackfleisch in MA-Verpackung gefunden und *Citrobacter freundii* in aerob gelagertem Fleisch. In späten Phasen der gekühlten Lagerung von Rindfleisch in MA-Atmosphäre und Vakuum spielen *Rahnella* spp. und *Serratia grimesii* eine dominierende Rolle unter den *Enterobacteriaceae* (Ercolini et al., 2006; Pennacchia et al., 2011).

Auch die Lagertemperatur hat neben der Gaskomposition Auswirkung auf die Zusammensetzung der Spezies innerhalb der *Enterobacteriaceae*. So konnten Doulgeraki et al. (2011) zeigen, dass bei Temperaturen von 0 - 5 °C *Serratia liquefaciens* auf Rinderhackfleisch dominiert; bei Temperaturen zwischen 10 - 15 °C dominiert *Hafnia alvei*.

Durch Gas aufgeblähte Vakuumverpackungen, grünliche Farbabweichungen und unangenehme Gerüche sind während des Fleischverderbs auftretende Defekte, die durch *Pantoea agglomerans*, *Serratia liquefaciens* und *Hafnia alvei* verursacht werden (Brightwell et

al., 2007; Chaves et al., 2012; Dainty et al., 1989; Stanbridge und Davies, 1998). Die Fähigkeit von *Enterobacteriaceae*, Aminosäuren zu übelriechenden flüchtigen Substanzen zu verstoffwechseln, trägt zusätzlich zu deren Beteiligung am Fleischverderb bei (Borch et al., 1996; Säde et al., 2013; Samelis, 2006).

### 3.2.2.3 *Pseudomonas* spp.

Die Gattung *Pseudomonas* beinhaltet ubiquitär vorkommende Bakterien, die sich unter anderem sowohl aus opportunistischen Pathogenen von Tieren und Menschen, als auch aus Phytopathogenen zusammensetzt (Cezard et al., 2015; Marcelletti und Scortichini, 2014). Auch gibt es unter ihnen Spezies, die das Wachstum von Pflanzen durch Interaktion mit deren Wurzeln positiv beeinflussen (Bona et al., 2017).

In der Humanmedizin spielt *Pseudomonas* (*P.*) *aeruginosa* bei anfälligen Patienten eine zunehmend bedeutende Rolle als opportunistischer Verursacher nosokomialer Infektionen und weist häufig multiple Antibiotikaresistenzen auf (Abdouchakour et al., 2018; de Bentzmann und Plésiat, 2011; Esposito und De Simone, 2017). Zudem sind einige Spezies unter den Pseudomonaden die vorherrschenden Verderbserreger auf aerob gelagertem, gekühltem Fleisch (Molin und Ternström, 1982).

Die Gattung *Pseudomonas* umfasst Gram-negative Bakterien in Stäbchenform (Stainer et al., 1966). Sie sind durch eine oder mehrere polare Flagellen beweglich und bilden keine Sporen (Stainer et al., 1966). Außerdem zeichnen sich alle Arten durch einen aeroben Energiestoffwechsel aus, wobei manche Vertreter auch Denitrifikation als anaerobe Alternative betreiben können (Stainer et al., 1966). Manche Spezies der Gattung *Pseudomonas* sind der Lage, fluoreszierende Pyoverdine, die als Eisentransporter fungieren, zu produzieren (Cezard et al., 2015). Auf dieser Grundlage können *Pseudomonas*-Spezies in zwei Gruppen eingeteilt werden: fluoreszierende *Pseudomonas* spp., wie beispielsweise *P. aeruginosa*, *P. putida* und *P. fluorescens* und nicht fluoreszierende *Pseudomonas* spp., wie beispielsweise *P. fragi* und *P. alcaligenes* (Cezard et al., 2015).

### Lebensmittelrelevanz

Im Lebensmittelbereich tragen einige Spezies in großem Umfang zum Verderbsprozess von proteinreichen Lebensmitteln, die gekühlt und aerob gelagert werden, bei (Nychas et al., 2008; Remenant et al., 2015). Hauptsächlich sind gekühltes Rindfleisch, Fisch, Geflügel, Milch

und Gemüse betroffen (Dominguez und Schaffner, 2007; Doulgeraki und Nychas, 2013; Lee et al., 2013; Quigley et al., 2013; Reynisson et al., 2008). Durch ihre proteolytische Aktivität und die Fähigkeit, bei Kühlhaustemperaturen zu wachsen, verschaffen sie sich einen ökologischen Vorteil für das Wachstum auf den genannten Lebensmitteln (Gill und Penney, 1977; Nychas et al., 2008; Robertson et al., 2013).

Auf Oberflächen in lebensmittelherstellenden bzw. -verarbeitenden Betrieben sind sie ebenfalls zu finden (Brightwell et al., 2006; Stellato et al., 2016). Die Fähigkeit hauptsächlich psychrotropher Pseudomonaden, Biofilme zu bilden, stellt dabei eine Herausforderung für die Reinigung von Geräten und Oberflächen in diesen Betrieben dar (Giaouris et al., 2014; Robertson et al., 2013; Wirtanen et al., 2001).

Die Spezies *P. fragi*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. gessardii* und *P. lundensis* wurden häufig aus verdorbenen Lebensmitteln isoliert und gehören zu den bedeutendsten Lebensmittelverderbserregern (De Jonghe et al., 2011; Ercolini et al., 2006).

Auf aerob gelagertem, gekühltem Fleisch sind *Pseudomonas* die dominierenden Verderbserreger (Gill und Newton, 1978). Am häufigsten wurde *P. fragi* auf verdorbenem Fleisch nachgewiesen, gefolgt von *P. lundensis*, *P. putida* und *P. fluorescens* (Dainty und Mackey, 1992; Ercolini et al., 2007; Ericksen und Molin, 1981; Molin und Ternström, 1982; Shaw und Latty, 1982; Stellato et al., 2017).

Vertreter der Gattung *Pseudomonas* werden hauptsächlich auf Fleisch, das in aerober Atmosphäre gelagert wurde, nachgewiesen und beherrschen dabei schnell die Verderbsmikrobiota (Labadie, 1999). Trotzdem kommt *P. fragi* auch in vakuumverpacktem Fleisch und in MA gelagertem Fleisch vor (Ercolini et al., 2010b; Ercolini et al., 2007; Pennacchia et al., 2011). Diese Spezies hat die Fähigkeit, bei niedrigen O<sub>2</sub>-Konzentrationen zu wachsen und besitzt eine gewisse Toleranz gegenüber CO<sub>2</sub> (Ercolini et al., 2010a; Gill und Jeremiah, 1991; La Storia et al., 2012).

Die meisten anderen Spezies können unter anaerober Lagerung von Fleisch nicht wachsen, wobei CO<sub>2</sub> das Wachstum von fluoreszierenden Pseudomonaden stärker hemmt als das Wachstum nicht-fluoreszierender Pseudomonaden (Gill und Tan, 1980). *P. fluorescens* wurde häufig auf frischem Fleisch nachgewiesen, jedoch wird diese Spezies während der aeroben Lagerung durch *P. fragi*, für den Fleisch eine ökologische Nische darstellt, verdrängt (Doulgeraki et al., 2012; Labadie, 1999; Lebert et al., 1998).



Eine Erhöhung der Lagertemperatur von Fleisch auf über 2 °C beschleunigt das Wachstum von *Pseudomonas* spp. (Bruckner et al., 2012a). Durch den pH-Bereich, den gekühltes Fleisch aufweist, wird das Wachstum von *Pseudomonas* spp. nicht beeinflusst (Gill und Newton, 1982).

Beim Fleischverderb sind *Pseudomonas* spp. sowohl verantwortlich für die Bildung von Schleim, also auch für den Strukturverlust des Lebensmittels durch die Bildung von extrazellulären Lipasen und Proteasen (Lebert et al., 1998; Nychas et al., 2008). Zudem werden Fremdgerüche durch die Bildung von Ketonen, Esther, Alkoholen und Aldehyden freigesetzt (Casaburi et al., 2015; Stanborough et al., 2018).

### 3.2.3 Interaktion zwischen Verderbserregern

Beim mikrobiellen Verderb von Lebensmitteln besteht eine ständige Interaktion der vorherrschenden Mikrobiota. Dabei handelt es sich zumeist um Antagonismus, Zell-zu-Zell Kommunikation und Metabiose (Gram et al., 2002). Die Interaktion zwischen den Organismen beginnt erst bei hohen Keimzahlen von  $10^8$  KbE/cm<sup>2</sup> (Gill, 1996). Keimwachstum und -selektion werden zudem von den chemischen und physikalischen Parametern beeinflusst (Gram et al., 2002).

Die Interaktion innerhalb der Verderbsmikrobiota kann sowohl schädliche als auch vorteilhafte Auswirkungen für die Mikroorganismen haben (Fredrickson, 1977). Durch das Wachstum oder durch Stoffwechselvorgänge eines Organismus kann das Wachstum eines Anderen gefördert werden (Gram et al., 2002), wie beispielsweise durch die Produktion von Nährstoffen, die ein anderer Organismus benötigt (Mossel, 1971).

So wird das Wachstum von Milchsäurebakterien in nährstoffarmen Lebensmitteln durch die Vitamin B-Synthese von Hefen oder Schimmelpilzen ermöglicht (Mossel, 1971; Purko et al., 1951). Auch die Änderung des pH-Werts durch einen Organismus kann sich vorteilhaft auf das Wachstum eines Anderen auswirken. So beschreiben Purko et al. (1951) die Anhebung des pH-Werts durch Hefen während der Käsereifung, was weniger säuretoleranten Bakterien sekundär das Wachstum ermöglicht.

Doch auch die Konkurrenz zwischen den Mikroorganismen spielt eine Rolle. Eine bedeutende Komponente ist das Vorhandensein von O<sub>2</sub>. *Pseudomonas* spp. dominieren auf aerob gelagertem Fleisch (Gill, 1996), während Sauerstoffmangel, zum Beispiel durch Vakuumverpackung oder Folienverpackung mit geringer Gaspermeabilität, das Wachstum von

Milchsäurebakterien begünstigt (Dainty et al., 1983; Egan, 1983). Milchsäurebakterien sind zudem in der Lage, durch Produktion von Bakteriozinen die Konkurrenzmikrobiota zu hemmen, was jedoch erst bei Erreichen ihres Wachstumsmaximums geschieht (Ahn und Stiles, 1990; Gill, 1996; Leisner et al., 1996). Organische Säuren, die als Fermentationsprodukt von Milchsäurebakterien gebildet werden, tragen zusätzlich zu ungünstigen Wachstumsbedingungen für andere Mikroorganismen bei (Egan, 1983).

Die Konkurrenz um Eisen ist ein weiterer Aspekt mikrobieller Interaktionen, da Eisen für die meisten Mikroorganismen ein essenzielles Spurenelement ist. Das Eisenangebot ist ein limitierender Faktor für bakterielles Wachstum. Daher sind viele Bakterien in der Lage, Siderophore zu bilden, die als Eisen-Komplexbildner von den Zellen sezerniert werden (Gram et al., 2002). Das gebundene Eisen wird komplexiert und anschließend von den Bakterien in die Zelle aufgenommen (Crosa, 1997). Pseudomonaden sind vorherrschend in der Produktion von Siderophoren, die eine hohe Eisenbindungskonstante haben und verschaffen sich dadurch einen Wachstumsvorteil (Gram et al., 2002).

Bakterielle Verhaltensmuster gehen unter anderem auch mit der Populationsdichte einher (Gram et al., 2002). Die Genexpression wird abhängig von der Zelldichte reguliert; ein Phänomen, das „quorum sensing“ genannt wird (Fuqua et al., 1994). Die Kommunikation basiert dabei auf chemischen Signalen wie Peptiden bei Gram-positiven Bakterien, oder N-acyl Homoserin Laktonen (AHLs) bei Gram-negativen Bakterien (Eberl, 1999; Kleerebezem et al., 1997). In Fisch, Rindfleisch und Truthahnfleisch wurden AHLs bereits nachgewiesen (Gram et al., 1999). Die Bedeutung des Vorhandenseins von AHLs in Lebensmitteln ist für den Verderbsprozess jedoch noch unklar (Gram et al., 2002).

### **3.3 Kontamination von Fleisch mit *Staphylococcus* spp.**

*Staphylococcus* spp. sind Gram-positive Kokken, die sich unter aeroben und aneroben Bedingungen vermehren können (Becker et al., 2014; Gattermann und Miksits, 2009). Sie sind ubiquitär vorkommende Umweltkeime, die die Haut und Schleimhaut von Menschen und Tieren kolonisieren (Cerca et al., 2005; Cramton et al., 1999; Planchon et al., 2006; Seo et al., 2008). Häufig sind *Staphylococcus* spp. für nosokomiale Infektionen sowie Infektionen aus der Umwelt verantwortlich (Mack, 1999; Martineau et al., 2001). Zudem sind *Staphylococcus* spp.

in der Lage, bedeutende Virulenzfaktoren wie Exotoxine, Oberflächenproteine und Biofilme zu produzieren (Cucarella et al., 2001; Schelin et al., 2011; Vasudevan et al., 2003).

Die Einteilung in koagulasepositive und koagulasenegative Staphylokokken beruht auf der Fähigkeit, freie Koagulase zu bilden. *S. aureus* ist der bedeutendste Vertreter der koagulasepositiven Staphylokokken (Becker et al., 2014; Gattermann und Miksits, 2009). Zudem unterscheiden sich koagulasenegative Staphylokokken von *S. aureus* durch die von ihnen ausgelösten Krankheitsverläufe (Gattermann und Miksits, 2009): Koagulasenegative *Staphylococcus* spp. spielen eine bedeutende Rolle als Bakteriämie-verursachende, nosokomiale Pathogene, wovon *S. epidermidis* und *S. haemolyticus* die Hauptvertreter sind (Becker et al., 2014; Kloos und Bannerman, 1994). *S. aureus* ist bekannt als Lebensmittel-Intoxikationserreger und zudem Verursacher von eitrigen Hautentzündungen, Wundinfektionen, Abszessen, septischen Krankheitsverläufen, Endokarditiden und anderen schwerwiegenden Entzündungen (Archer, 1998).

### **Lebensmittelrelevanz**

Der Nachweis koagulasepositiver Staphylokokken wird als Prozesshygienekriterium für Milch und bestimmte Milch- und Fischereierzeugnisse aufgeführt (VO (EG) Nr. 2073/2005). Auch sind Staphylokokken-Enterotoxine in derselben Verordnung über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel als Lebensmittelsicherheitskriterium für Käse, Milch- und Molkepulver gemäß denselben Kriterien für koagulasepositive Staphylokokken gelistet und dürfen hierbei in 5 Probeeinheiten einer Stichprobe jeweils in 25g nicht nachweisbar sein (VO (EG) Nr. 2073/2005).

In den Richt- und Warnwerten der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) sind koagulasepositive Staphylokokken als Kriterium für unter anderem Brühwurst, Kochwurst, Kochpökelware, Sülzen und Aspikwaren; rohes, gewürztes oder mariniertes Schweinefleisch und ungewürztes und gewürztes Hackfleisch aus Schweine- und/oder Rindfleisch auf Handelsebene aufgeführt (DGHM, 2014a, 2014b, 2018b).

Auf frischem Fleisch ist das Vorkommen verschiedener *Staphylococcus* spp., wie *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. succinus*, *S. saprophyticus* und *S. pasteurii* beschrieben (Blickstad und Molin, 1983a; Dainty und Mackey, 1992; Doulgeraki et al., 2012; Ercolini et al., 2006; Nychas et al., 2008; Olsson et al., 2003). Die Kontaminationsquellen dafür sind einerseits landwirtschaftliche

Nutztiere; andererseits ist die Personalhygiene des Schlachthof- und Zerlegepersonals von Belang für deren Übertragung auf Fleisch (Blagojevic und Antic, 2014; Rho et al., 2001).

Die größte Bedeutung von *Staphylococcus* spp. auf Fleisch liegt bei der Spezies *S. aureus*, die zu den auf Fleisch vorkommenden fakultativen Pathogenen zählt (Huffman, 2002; RKI, 2016). Enterotoxische *S. aureus*-Stämme sind in der Lage, hitzestabile Staphylokokken-Enterotoxine (SE) zu produzieren und gehören zu den Hauptverursachern von Lebensmittelintoxikationen (Le Loir et al., 2003; Pu et al., 2010).

SE kommen hauptsächlich in Fleisch, Fleischerzeugnissen, Geflügel, Fisch, Schalentieren und Milchprodukten vor (Wieneke et al., 1993). Bislang sind 23 verschiedene niedermolekulare SE mit strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten bekannt (Abolghait et al., 2020). Sie sind hitzebeständig und resistent gegenüber einer Inaktivierung durch gastrointestinale Proteasen (Balaban und Rasooly, 2000). Im Lebensmittel muss eine Bakterienkonzentration von  $10^5$  bis  $10^8$  KbE/g vorhanden sein, um eine effektive Dosis an SE zu produzieren (BfR, 2005). SE werden hauptsächlich in proteinreichen Lebensmitteln, wie Fleisch und Milchprodukten produziert (Sergelidis und Angelidis, 2017). Temperaturen zwischen 10 - 46 °C, pH-Werte zwischen 5,0 - 9,6,  $a_w$ -Werte zwischen 0,86 - 0,99 und Redoxpotentiale von -100 bis +200 mV haben einen verstärkenden Einfluss auf die Produktion von SE in Lebensmitteln (Schelin et al., 2011).

Zu den Symptomen, die durch die Aufnahme der SE verursacht werden, gehören Übelkeit, Erbrechen, Bauchkrämpfe und Durchfall (Pu et al., 2010). Charakteristisch für eine Lebensmittelintoxikation mit SE ist zudem eine kurze Inkubationszeit von zwei bis sechs Stunden und ein nicht letaler, selbstlimitierender Verlauf nach ca. 24 Stunden (Balaban und Rasooly, 2000; Le Loir et al., 2003). Neben der stark emetischen Komponente der SE fungieren diese auch als Superantigene, die einen toxischen Schock durch unspezifische T-Zell Stimulierung hervorrufen können (Balaban und Rasooly, 2000).

Eine große Bedeutung für die Gesundheit von Mensch und Tier besitzen Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) (Köck et al., 2013a). MRSA sind aufgrund ihrer Methicillin-Resistenzdeterminante (*mec*), die unter anderem aus dem *mecA*-Gen und regulatorischen Elementen besteht, gegen nahezu alle verfügbaren Beta-Laktam Antibiotika resistent (EFSA, 2009; RKI, 2016). Die Methicillinresistenz ergibt sich aus der Bildung des zusätzlichen Penicillinbindeproteins PBP2a, das eine nur geringe Affinität für  $\beta$ -Laktamantibiotika besitzt

und daher eine Kreuzresistenz gegen alle Vertreter dieser Antibiotikagruppe bedingt (RKI, 2016).

Healthcare-associated MRSA (HA-MRSA) sind seit den 1970er Jahren dafür bekannt, Infektionen zu verursachen, die im Zusammenhang mit Krankenhausaufenthalten stehen (Deurenberg et al., 2007; EFSA, 2009). Die Verbreitung von community-associated MRSA (CA-MRSA) wird beim Menschen außerhalb von Krankenhäusern seit den frühen 1990er Jahren beobachtet (Deurenberg et al., 2007). Zudem wird in jüngerer Vergangenheit zunehmend von livestock-associated MRSA (LA-MRSA) berichtet, die von lebensmittelliefernden Nutztieren wie Schweinen, Rindern und Geflügel isoliert werden (EFSA, 2009). Auch Haustiere spielen eine Rolle als Träger von MRSA (EFSA, 2009).

Das Vorkommen von LA-MRSA ist ein hochaktuelles Thema, da eine Übertragung auf den Menschen sowohl über direkten Tierkontakt oder die Umwelt als auch über Fleisch von MRSA-tragenden Nutztieren erfolgen kann (Köck et al., 2013b). Auch wurden LA-MRSA Stämme aus dem Umfeld von Krankenhäusern isoliert (van Rijen et al., 2008).

In vielen Studien wurde MRSA von Fleisch und aus Milch und Milchprodukten isoliert (Abolghait et al., 2020; Bernier-Lachance et al., 2020; Hanson et al., 2011; Normanno et al., 2007). Auf Lebensmitteln kommen sowohl HA-MRSA als auch CA-MRSA und LA-MRSA vor, da die Pathogene mittlerweile innerhalb der Nischen (Krankenhäuser, Pflegeeinrichtungen, Menschen, Nutztiere, Haustiere und Lebensmittel) zirkulieren (Sergelidis und Angelidis, 2017).

Normanno et al. (2007) stellten in einer Studie fest, dass 10 % der von ihnen untersuchten Fleischprodukte und 17 % der Milchprodukte mit *S. aureus* kontaminiert waren. Dabei war die Kontaminationsrate von Milchprodukten signifikant höher als die der Fleischprodukte. Von allen isolierten Stämmen zeigten 68,8 % antimikrobielle Resistenz gegen mindestens ein getestetes Antibiotikum; 47,2 % aller Isolate waren multiresistent (Normanno et al., 2007).

Der Verzehr von Lebensmitteln, die mit resistenten Erregern kontaminiert sind, kann zur asymptomatischen Besiedelung des Verdauungstraktes führen. Wird während dieser Kolonisierung die physiologische Darm-Mikrobiota durch die Einnahme eines Antibiotikums geschwächt, kann dies in schwerer klinischer Erkrankung durch den resistenten Erreger enden (Glynn et al., 2004).

Werden Lebensmittel korrekt gekocht, ist das Risiko, durch den Verzehr von mit MRSA

kontaminierten Lebensmitteln zu erkranken, meist irrelevant (Sergelidis und Angelidis, 2017). Das Risiko einer Infektion mit MRSA durch ein Lebensmittel ist grundsätzlich abhängig von der Lebensmittelhygiene, der MRSA-Population im Lebensmittel und der Fähigkeit des MRSA-Stammes, den Konsumenten zu kolonisieren (Sergelidis und Angelidis, 2017).

Um eine weitere Verbreitung von MRSA und das Vorkommen von Staphylokokken-Lebensmittelvergiftungen zu minimieren, gilt es, effektive Kontrollsysteme innerhalb der ganzen Produktionskette von Lebensmitteln tierischen Ursprungs anzuwenden (EFSA, 2009). Dazu gehören beispielsweise die Gute Herstellungspraxis (good manufacturing practice, GMP), Gute Hygienepraxis (good hygiene practice, GHP) und HACCP-Konzepte.



## 4 Publikation

PII: S0168-1605(20)30426-8

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108932>

Reference: FOOD 108932

To appear in: International Journal of Food Microbiology

Received date: 9 July 2020

Revised date: 20 September 2020

Accepted date: 15 October 2020

Copyright: 2020 Published by Elsevier

**Development of two specific multiplex qPCRs to determine amounts of *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* and *Staphylococcus* in meat and heat-treated meat products**

Eunike Bahlinger, Samart Dorn-In, Philipp-Michael Beindorf, Sirkka Mang, Florian Kaltner, Christoph Gottschalk, Manfred Gareis, Karin Schwaiger

Faculty of Veterinary Medicine, Chair of Food Safety, LMU Munich, Schoenleutnerstr. 8, 85716 Oberschleissheim, Germany

**Corresponding author:**

Eunike Bahlinger, [eunike.bahlinger@ls.vetmed.uni-muenchen.de](mailto:eunike.bahlinger@ls.vetmed.uni-muenchen.de)



## Abstract

Culturing methods are conventionally applied to investigate the contamination of food with several microorganisms after heat processing. However, with these methods, it is not possible to evaluate whether heat-treated meat products, such as cooked sausages, contained parts of spoiled meat. Therefore, two specific multiplex qPCRs were developed in this study in order to determine the microbiological quality of the raw materials used for these products. The PCR targets focused on four bacterial groups often found on meat (family *Enterobacteriaceae*, genus *Pseudomonas*, genus *Staphylococcus* and species *Brochothrix thermosphacta*). Specificity as well as sensitivity of the developed multiplex qPCRs, validated by using 68 microbial species, were 100%. The applicability of both multiplex qPCRs compared to culturing methods was performed using 96 meat samples (fresh and naturally spoiled) and 12 inhouse-made “Lyoner” sausages containing variable ratios of spoiled meat (0%, 5%, 12% and 25%;  $n = 3$  for each group). Both methods showed similar results by evaluating the  $\Delta\log_{10}$  cfu/g, the relative accuracy and the t-test analysis ( $p > 0.05$ ). Comparing qPCR results of the different sausage groups, a significant difference between sausages containing fresh meat and sausages containing spoiled meat (12% and 25%) was found only for *Pseudomonas* and *B. thermosphacta* in both raw and cooked sausages. The statistical difference between 5% vs. 12% and 25% spoiled meat in cooked sausages, was also found only for these two bacterial groups. The developed multiplex qPCRs were further applied to 30 commercially available “Bologna-type” sausages. The results showed a total of 14 sausages considered to be suspicious for Food Fraud. While the role of *Staphylococcus* spp. in meat spoilage remains unclear, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and *B. thermosphacta* could together be used as an indicator for “spoiled meat” used in sausages. The developed qPCR systems in this study allow the detection of four relevant bacterial groups in the heated Bologna-type sausages and provide information about the hygienic quality of raw materials used. This method could thus be helpful for screening food suspected of Food Fraud.

**Keywords:** spoilage; sausage; microorganism; retail; Food Fraud

## 1 Introduction

Meat is an important nutrient source and, therefore, an ecological niche for various species of bacteria (Ercolini et al., 2010; Labadie, 1999). The overgrowth of undesirable microorganisms and changes of meat characteristics such as off-odors, off-flavors, gas production and color change result in spoilage of meat (Borch et al., 1996; Casaburi et al., 2015). Microorganisms which are often responsible for meat spoilage are *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* and *Brochothrix* (B.) *thermosphacta* (Pennacchia et al., 2011). *Pseudomonas* species, such as *P. fragi*, *P. putida* and *P. fluorescens*, are mainly a cause of spoilage if the meat is stored aerobically at low temperatures (EFSA, 2016; Ercolini et al., 2007; Kameník, 2013; Nychas et al., 2008), while cold-tolerant species of the family *Enterobacteriaceae*, such as *Serratia liquefaciens*, *Serratia proteamaculans*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. and *Pantoea* spp., contribute to spoilage of chilled meat stored under inadequately maintained conditions (Doulgeraki et al., 2012; Ercolini et al., 2006; Nychas et al., 2008; Odeyemi et al., 2020). *Brochothrix thermosphacta* is also an important spoilage microorganism of meat stored either in aerobic, anaerobic or modified atmosphere (Ercolini et al., 2006; Gribble and Brightwell, 2013; Odeyemi et al., 2020; Pennacchia et al., 2009; Pin et al., 2002).

Besides the above-mentioned spoilage microorganisms, bacteria which are ubiquitous in the environment were also isolated from meat, e.g. *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. and *Micrococcus* spp. (Doulgeraki et al., 2012; Ercolini et al., 2006; Stellato et al., 2016). *Staphylococcus* spp. are commonly found on fresh meat. Some strains of coagulase negative staphylococci such as *S. carnosus* and *S. equorum* were commonly used as starter cultures for cured meat products (Landeta et al., 2013), while *S. aureus* plays an important role in Food Safety due to its heat-stable enterotoxins (Kadariya et al., 2014; Le Loir et al., 2003; Nychas et al., 2008). Although many *Staphylococcus* species, such as *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. haemolyticus*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. pasteurii*, *S. saprophyticus*, *S. succinus* and *S. xylosus*, were often isolated from fresh and from chilled raw meat (Doulgeraki et al., 2012; Ercolini et al., 2006; Nychas et al., 2008; Osman et al., 2016), their role in meat spoilage is rarely addressed.

In the food industry, spoilage of meat can cause a significant economic loss, when a huge amount of spoiled meat has to be discarded. When processing such spoiled raw materials to

heat-treated or cooked products, routine microbiology using culture methods would not be able to detect Food Fraud. Inactivated microorganisms in food may not necessarily cause health problems for consumers. However, according to the European Regulation (EC) No 178/2002, unsafe food and food unsuitable for human consumption, such as spoiled food, is prohibited to be sold for human consumption. Thus, the processing of spoiled meat is considered as Food Fraud and forbidden by law. Culturing is conventionally used as the official “gold standard method” to detect and to quantify microorganisms in food. It is also applied for heat-treated meat products to investigate recontamination after heating. However, it cannot be applied to evaluate the original microbial contamination level of raw material in cooked products, since most food microorganisms are inactivated by heat. Thus, further methods such as molecular biological methods are required to reconstruct the DNA of target microorganisms in raw material in cooked products. By using quantitative PCR (qPCR), it is possible to quantify the relative amount of target microorganisms by so-called “colony forming units per gram equivalent” (cfu/g equivalent). According to their common presence in food and their relevance to meat spoilage as mentioned above, four bacterial groups, namely *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, *B. thermosphacta* and *Staphylococcus* spp. were selected as target organisms in this study. The objective was to develop multiplex qPCRs in order to detect and to quantify these four bacterial groups in heat-treated meat products, such as spoiled “Lyoner-type” sausages (produced in-house) and “Bologna-type” sausages (German: “Brühwurst”) purchased at retail.

## 2 Material and Methods

### 2.1 Samples

#### 2.1.1 Reference microbial strains

A total of 68 microbial species (69 strains, see Table 1) were included in this study in order to validate the specificity and sensitivity of the developed multiplex qPCRs. Almost all of these species were isolated from different food items in-house at the Chair of Food Safety, LMU Munich. Eleven species/strains from four bacterial target groups from the family *Enterobacteriaceae* ( $n = 3$ ), and the genera *Staphylococcus* ( $n = 3$ ), *Pseudomonas* ( $n = 3$ ) and *B. thermosphacta* ( $n = 2$ , see Table 2) were used to establish standard curves for the multiplex qPCRs.

### 2.1.2 Meat samples

During 2018 - 2019, fresh meat samples ( $n = 15$ , each 1 - 2 kg) from pork shoulder were collected independently from five butchers in Southern Bavaria, Germany. All fresh meat samples were collected within 24 hours after slaughtering. Twelve samples thereof were purposefully spoiled through storage under natural conditions (see Section 2.2). An additional three fresh meat samples (including fat from the back) were used for the production of Lyoner-type sausages with variable ratios of spoiled meat (see Section 2.3).

Ground meat used for evaluating potential matrix effects was obtained from a local supermarket. Ten grams of ground meat were filled in a falcon tube and submitted for Gamma ray irradiation (200 kGy, Synergy Health GmbH, Germany) in order to destroy any DNA. Other samples used for matrix effect evaluation were spoiled meat (stored at 22 °C for 2 days) and inhouse-made raw sausage. The latter two samples were chosen on condition that the original amount of target bacteria had to be lower than the amount of each inoculated bacterial group ( $< 7.0$  vs.  $8.4 \log_{10}$  cfu/g, respectively, see Section 2.5).

After development and validation of the multiplex qPCRs with all samples described above, they were further applied to 30 “Bologna-type” sausages (German: “Brühwurst”) such as Lyoner, Gelbwurst, Wiener Würstchen, Bockwurst, Jagdwurst, Mortadella, Schinkenwurst, Fleischwurst, Bierschinken and Leberkäse. Bologna-type sausages are defined by German guiding principles for meat and meat products (Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2019). The main compositions of these heated sausages are raw minced meat, sodium chloride or other salts for technological solubilization and water or ice. The mixture is finally treated with heat (e.g. boiling, baking and frying) until the core temperature of the sausages is approximately 72 - 75 °C (Beck et al., 2008; Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2019). By treating with heat, the muscle protein of the meat coagulates and the sausage becomes and stays firm. Eighteen of these Bologna-type sausages were sampled in seven supermarkets, the other twelve sausages were obtained from seven butchers in Southern Bavaria, Germany.

### 2.2 Spoilage of meat under natural conditions

Twelve fresh meat samples were naturally spoiled and investigated independently. About 1 kg of each pork sample was cut under sterile conditions into small pieces (approximately

5 x 5 x 5 cm) which were equally separated into two subsamples. Each subsample was placed in a sterile plastic box and loosely covered with a top. The subsamples were stored aerobically at 4 °C for 20 days and at 22 °C for 6 days, respectively. The microbial investigation (see Section 2.5) of each subsample was carried out on day 0 (day of acquisition, = fresh meat) and day 6, day 13 and day 20 for meat stored at 4 °C. Meat stored at 22 °C was investigated on day 1, day 2, day 3 and day 6 after acquisition. Additionally, each subsample of meat was grossly investigated for spoilage appearance on the day of microbial investigation. According to the deviation of odor, color and consistency, they were classified on a spoilage scale including “moderately” or “strongly spoiled”.

### 2.3 Production of Lyoner-type sausages containing spoiled meat

For the validation of the multiplex qPCRs, three independent replicates of Lyoner-type sausages, containing spoiled meat were produced in-house at the Chair of Food Safety (LMU Munich, Germany). Each replicate was divided into four subsamples of sausages, with each having a different percentage of fresh meat being replaced by spoiled meat (stored at 22 °C for 2 days): 0% (only fresh meat), 5%, 12% and 25% spoiled meat.

For a single approach, each fresh pork sample from the shoulder (2 kg) was divided into two parts. The first part (1.5 kg) was stored at -20 °C for 2 days and the second part (0.5 kg) was naturally spoiled at 22 °C for 2 days. The microbiological investigation of both meat parts was carried out as described in Section 2.5 on the day they were processed into Lyoner. The inhouse-made Lyoner-type sausage contained about 48.6% fresh and variable ratios of spoiled meat (as described above), 24.3% fresh pork backfat, 24.3% ice, 1.8% nitrate pickling salt, 0.5% cutter aids and 0.5% Lyoner condiment. All ingredients (about 1.0 kg) were mixed together in a meat cutter (Retsch, Germany) and then filled in a synthetic sausage-casing. One sausage was taken as a control for microbial investigation prior to heating (see Section 2.5). The remaining sausages were heated in a convector oven (Rational, Germany) up to a core-temperature of 72 °C for 2 min. After that, they were cooled down at a room temperature of 18 °C.

### 2.4 Sample preparation for culturing and for DNA extraction

All samples were aseptically taken out from their packages and sausage-casing. For irradiated ground meat, fresh and spoiled meat and raw Lyoner-type sausages produced from fresh meat

(see Section 2.1, 2.2 and 2.3), 10 g of the sample and 90 ml peptone water (Merck, Germany) were homogenized for 90 sec using a laboratory stomacher. Since all Bologna-type sausages from retail/butchers (see Section 2.3) possessed a firm and elastic consistence, the preparation of samples was modified as follows: 20 g of the sample and 180 ml peptone water were homogenized for 20 sec using a food mixer (Krups, type KB3031, Germany), and after that the homogenate was transferred into a stomach bag and further homogenized for 5 sec in a stomacher. The homogenates (dilution 10<sup>-1</sup>) of all sample types were processed for DNA extraction (see Section 2.6), while only homogenates from raw meat (fresh and spoiled) and raw sausages were further serially diluted for culturing (see Section 2.5).

## 2.5 Cultural methods

For pork and raw sausage samples described in Section 2.2 and Section 2.3, each homogenate sample (10<sup>-1</sup>, see Section 2.4) was serially diluted up to dilution 10<sup>-8</sup>. After that, 100 µl of 3 appropriate dilutions were spread on 4 selective agars: Violet-Red-Bile-Dextrose Agar (VRBD; Merck, Germany) for *Enterobacteriaceae*, Cetrimid-Fucidin-Cephalothin Agar (CFC; Oxoid, United Kingdom) for *Pseudomonas* spp., Streptomycin-Thallium-Acetate Agar (STA; Oxoid, United Kingdom) for *B. thermosphacta* and Baird-Parker Agar (BP; VWR International and Merck, Germany) for *Staphylococcus* spp. Each selective agar was incubated under the following conditions: anaerobically at 30 °C for VRBD, aerobically at 25 °C for CFC and STA and aerobically at 37 °C for BP. Colony counting of all agar plates was performed after 48 hours of incubation.

Each bacterial species (n = 11, Table 2) used for establishing standards for multiplex qPCRs was subcultured on columbia blood agar (Oxoid, United Kingdom) and incubated aerobically for 48 hours at temperatures as described above. After that, the colonies were harvested by flushing the plate with 4 ml of 0.9% sterile sodium chloride (NaCl). One milliliter of cell suspension was serially diluted in 9 ml of 0.9% NaCl up to dilution 10<sup>-12</sup>. Then, 100 µl of dilutions 10<sup>-6</sup> - 10<sup>-12</sup> were spread on plate count agars (Merck, Germany), which were subsequently incubated aerobically for 48 hours at the same temperatures as described above. The rest of the original cell suspension was stored at -20 °C to prevent further growth of bacteria. After the plate counting was completed, the number of cells in the original suspension (cfu/ml) was calculated accordingly. Each bacterial suspension was adjusted to 10<sup>9</sup> cfu/ml sodium chloride. Then, they were mixed equally with other bacteria within the same

group (*Enterobacteriaceae* / *Pseudomonas* / *B. thermosphacta* / *Staphylococcus*). After that, all four groups were mixed together in equal amounts, until bacterial numbers reached  $2.5 \times 10^8$  cfu/ml sodium chloride within each group. This mixture of the four bacterial target groups was further diluted (1:10, final concentration =  $2.5 \times 10^7$  cfu/ml) in sodium chloride and in each homogenate of irradiated meat, spoiled meat and raw sausage (see Section 2.4). Subsequently, all bacterial suspensions (with matrices) were processed for DNA extraction and for qPCR in order to evaluate the effect of sample matrices and to establish a standard dilution for the quantification of the bacterial target groups in multiplex qPCRs.

## 2.6 DNA extraction

First, the influence of sample matrices (sodium chloride, meat, irradiated meat, sausage) on the efficiency of DNA extraction was evaluated. The pure culture suspension and artificially contaminated homogenate samples (see Section 2.4) were processed for DNA extraction using a commercially available ISOLATE II Genomic DNA Kit (Bioline, United Kingdom). 200 µl of sample suspension were first mixed with 10 µl of lysozyme (20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH: 8.0; final concentration = 1 mg/ml) and incubated for 30 min at 37 °C. The following steps from pre-lysis with buffer GL, protein digestion with enzyme proteinase K to the extraction of DNA were performed according to the instruction manual of the DNA extraction kit. After evaluation of the matrix effect by qPCR, the DNA extraction of all other homogenate samples (dilution 10 - 1, see Section 2.4) was carried out as described above. Each sample was extracted twice and the extracts were independently subjected to multiplex qPCRs.

## 2.7 Multiplex qPCRs

Primers and probes were designed using the online software provided by NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). The 16S rRNA genes of representative species of each bacterial group from NCBI (*Pseudomonas putida* (accession: KF278708), *Serratia proteamaculans* (AB334771), *B. thermosphacta* (AY543024) and *Staphylococcus aureus* (BX571856)) were used as templates to design primers and probes. The primarily selected sequences were individually compared with the 16S rRNA gene of about 205 bacterial species provided in the Genbank (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>, data not shown), to make sure that there were at least 2 - 3 mismatching base pairs with other bacterial groups. These 205 bacterial species included lactic acid producing bacteria (n = 54), *Enterobacteriaceae* (n = 34), *Pseudomonas* (n = 7), *Staphylococcus* (n = 24), *Clostridium* (n =

30), *B. thermosphacta* (n = 3 strains) and other bacteria (n = 54). Additionally, the selected sequences were also tested for binding to mitochondria and chloroplasts of eight plant species, as well as mitochondria of four live stock animal species. After that, the specificity and sensitivity of the final primer pair and probe combinations were determined according to Lemmon and Gardner (2008) by testing DNA extracts of 63 bacterial and five yeast species (see Table 1). The equation for the sensitivity is false negatives divided by (true positives + false negatives) and for the specificity is false positives divided by (true negatives + false positives). Table 3 shows the sequences of primers and probes of the two multiplex qPCRs developed in this study. The first multiplex qPCR aimed to detect and quantify *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus* spp., whereas the second multiplex qPCR was designed for *Pseudomonas* spp. and *B. thermosphacta*. While three bacterial groups could be detected using one probe for each group, two probes were required to detect all species of *Staphylococcus*. Probe Staph 151-Hex detected only 10 *Staphylococcus* species including *S. aureus*, since it had 3 base mismatches with the other 12 species of *Staphylococcus*. Therefore probe Staph 154-Hex was additionally designed and combined with probe Staph151-Hex. Both probes were used in the same reaction tube of the multiplex qPCR in order to detect almost all *Staphylococcus* species, if present in meat products.

For quantification of bacterial target groups in samples, a 10-fold dilution of the DNA extract with matrix (spoiled meat) was applied as a standard dilution in both multiplex qPCRs. The concentration of each bacterial group in the standard dilution ranged from  $2.5 \times 10^8$  to  $2.5 \times 10^1$  cfu equivalent/g meat. Two DNA extracts of each sample were quantified independently using the multiplex qPCRs. The mean values of both DNA extracts were used to evaluate the bacterial contamination level of meat.

Each PCR reaction, either for single or multiplex qPCRs, contained 0.25  $\mu$ M primer, 0.1  $\mu$ M probe, 10  $\mu$ l SensiFAST™ Probe No-ROX Kit (Bioline, United Kingdom) and 2  $\mu$ l DNA template. The volume was filled up to 20  $\mu$ l with H<sub>2</sub>O. The amount of DNA in each extract used for PCR amplification was variable between very low (or not detectable in some fresh meat samples) to 4.5 ng/ $\mu$ l (in spoiled meat), measured by using a NanoPhotometer (type NP80 mobile, Impln GmbH, Germany). The multiplex qPCR runs were carried out using the Biorad CFX96 Touch™ (Biorad, United States). The qPCR program started with initial denaturation at a temperature of 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles in a series of denaturation at 95 °C for 10 sec and annealing and elongation at 60 °C for 30 sec.



## 2.8 Statistical analysis

The results obtained by culturing (cfu/g) and by multiplex qPCRs (cfu/g equivalent) were compared for their relative accuracy (RA) as described by Pennacchia et al. (2009) and Martín et al. (2006). Relative accuracy is a method to determine how close a measured value (multiplex qPCR) is to a standard value (culture). The relative accuracy (%) was applied to 12 pork samples (naturally spoiled at 4 °C and 22 °C) and to all inhouse-made raw/cooked Lyoner-type sausages including their raw material (fresh and spoiled meat). Additionally, t-test analysis (OriginPro 2020, Origin Labs) with level of significance  $p < 0.05$  was applied to inhouse-made raw/cooked sausages and their raw material in order to evaluate the comparability between both laboratory methods.

## 3 Results

### 3.1 Development of two multiplex qPCRs

In this study, a total of 4 single qPCR systems (reactions and reagents, see Section 2.7) were primarily developed in order to detect and to quantify four bacterial groups, namely *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *B. thermosphacta* and *Staphylococcus*. All four qPCR systems were independently analyzed for their specificity and sensitivity by testing DNA extracts of 68 bacterial species (see Table 1). The qPCR systems to detect *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and *B. thermosphacta* showed specificities and sensitivities of 100%. The sensitivity of the qPCR for *Staphylococcus* was 100%, but the specificity was 99%, since one of the two probes for *Staphylococcus* slightly binds to the 16S rRNA gene of *Bacillus cereus*. At bacterial concentrations of  $10^7$  cfu/ml, the Ct-value of the false positive *Bacillus* was above 36.0 PCR cycles, while Ct-values of *Staphylococcus* spp. were between 19.2 and 20.2 PCR cycles.

The influence of matrix types on the efficiency of DNA extraction and PCR amplification was analyzed by comparing the Ct-values obtained from each matrix type (sodium chloride, irradiated meat, spoiled meat and raw sausage, see Section 2.1) artificially contaminated with the mixture of four bacterial target groups (contained  $2.5 \times 10^7$  cfu/ml per group, see Section 2.5). The Ct-values and standard deviations obtained from all artificially contaminated matrix types were  $19.82 \pm 0.49$ ,  $18.35 \pm 0.22$ ,  $17.35 \pm 0.27$  and  $19.84 \pm 0.25$  PCR cycles for *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *B. thermosphacta* and *Staphylococcus*, respectively. The results show that

the matrix types such as irradiated meat, spoiled meat and raw sausage had no significant effect on the efficiency of DNA extraction and PCR amplification, since the Ct-values obtained from those matrices are almost the same as the Ct-values obtained from artificially contaminated sodium chloride.

DNA extracts of spoiled meat suspensions artificially contaminated with four bacterial groups as described above were serially diluted, containing  $2.5 \times 10^8$  to  $2.5 \times 10^2$  cfu/g per group of target bacteria, in order to establish the standard dilutions for qPCRs. Fig. S1 (see supplementary data) exemplarily shows the fluorescence signal of samples as well as standard curves obtained from a single run of two multiplex qPCRs. The slopes and PCR efficiencies of standard curves from all PCR runs ( $n = 9$ ) were -3.15 (+0.14) and 107.8 (+6.6)% for *Pseudomonas*, -3.55 (+0.08) and 91.1 (+2.8)% for *Enterobacteriaceae*, -3.51 (+0.12) and 92.8 (+4.3)% for *B. thermosphacta* and -3.52 (+0.17) and 92.4 (+5.7)% for *Staphylococcus*. The limit of quantification was  $2.5 \times 10^3$  cfu/g for *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae* and  $2.5 \times 10^2$  cfu/g for *B. thermosphacta* and *Staphylococcus*. The limit of detection of all multiplex qPCRs was 1.0 log<sub>10</sub> under the limit of quantification.

In order to reduce the time of investigation and material costs of using four independent qPCR systems, a single multiplex qPCR was subsequently developed. Primers and probes for all bacterial groups were included in one qPCR reaction tube. However, the results showed that the intensity of fluorescence signals of some probes was impaired; the limit of quantification was one log<sub>10</sub> level higher than that of the single qPCR systems. Therefore, two multiplex qPCRs were finally developed as shown in Table 3. The limit of quantification and limit of detection of both multiplex qPCRs for target bacterial groups were similar to those obtained by the above-described single qPCR systems.

### 3.2 Growth of target microorganisms

Growth of target microorganisms on naturally spoiled meat ( $n = 12$ ) was determined by cultural methods (see Fig. 1). The original amount of target bacteria on fresh meat, sampled at the day of acquisition (day 0) from butchers, was variable from less than 2.0 log<sub>10</sub> cfu/g for all target bacterial groups to 4.0 log<sub>10</sub> cfu/g for *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus* and up to 6.0 log<sub>10</sub> cfu/g for *Pseudomonas* and *B. thermosphacta*.

For almost all meat samples stored at 22 °C, all target organisms reached a growth plateau between day 2 and day 3 of storage (see Fig. 1). The number of target bacteria on the last day of testing (day 6) was between 9.0 and 10.0 log<sub>10</sub> cfu/g for *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae*, independent from their initial contamination at day 0. For *B. thermosphacta* and *Staphylococcus*, growth started to stagnate at day 3 and their number at day 6 was variable (between 6.0 and 10.0 log<sub>10</sub> cfu/g), which corresponded to their initial contamination load at day 0. No growth of *B. thermosphacta* and *Staphylococcus* was observed in 5 and in 4 meat samples investigated at day 6, respectively.

For meat samples stored at 4 °C (data not shown), almost all target organisms reached their growth plateaus by day 13. Only *Pseudomonas* reached the same number as obtained from meat stored at 22 °C, namely 8.5 - 10.0 log<sub>10</sub> cfu/g. The highest amounts of the other 3 target bacteria between day 6 and day 20 were between 6.0 and 10.0 log<sub>10</sub> for *Enterobacteriaceae*, 6.0 - 9.0 log<sub>10</sub> for *B. thermosphacta* and 4.0 - 7.5 log<sub>10</sub> cfu/g for *Staphylococcus*. Only in one sample from day 20, *Pseudomonas* could not be isolated. *Enterobacteriaceae*, *B. thermosphacta* and *Staphylococcus* were not detectable in 5, 2 and 4 samples at day 6, in 2, 3 and 5 samples at day 13, and in 6, 6 and 8 samples at day 20 of storage, respectively.

### 3.3 Comparison of qPCR and culture

Cultivation is a gold standard method to detect and quantify target microorganisms in meat and meat products. Therefore, in order to validate the applicability of the developed multiplex qPCRs, results have to be compared. Difference ( $\Delta$ ) of log<sub>10</sub> cfu/g and relative accuracy (RA) were evaluated for comparison.

For this purpose, all meat suspensions (n = 96, dilution 10<sup>-1</sup>) previously used for serial dilution for culturing (see Section 3.2) were processed for DNA extraction and subsequent multiplex qPCRs. The target organisms were quantified using standard dilutions of DNA extracts of spoiled meat artificially contaminated with four groups of bacteria as described in Section 3.1. The quantitative results of all samples obtained from multiplex qPCRs were converted to their log<sub>10</sub> cfu/g equivalent.

Fig. 2 shows the  $\Delta$ log<sub>10</sub> cfu/g and relative accuracy (RA, in percentage) of the results obtained from both methods. As these results in Fig. 2 show, the RA values were between 89 and 125% for *Pseudomonas*, 87 - 141% for *Enterobacteriaceae*, 68 - 147% for *B. thermosphacta* and

76 - 152% for *Staphylococcus* within the  $\Delta +1.0 \log_{10} \text{ cfu/g}$ . Higher  $\Delta (+) \log_{10}$  values ( $> \Delta (+)2.0 \log_{10}$ ) were mostly from samples with no growth on agar as described in Section 3.2, but the DNA could be detected and quantified. Samples with  $\Delta \log_{10}$  values of less than  $\Delta (-)2.0 \log_{10}$ , especially samples tested for *Staphylococcus* and *B. thermosphacta*, were solely from meat with obvious spoilage appearance (day 2, 3 and 6 stored at 22 °C and day 13 and 20 stored at 4 °C). The results of this Section show that samples with  $\Delta (+)1.0 \log_{10} \text{ cfu/g}$  were 56.8%, 46.3%, 50.5% and 41.1% for *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *B. thermosphacta* and *Staphylococcus*, respectively. Percentages of samples with  $\Delta > (-)1.0 \log_{10}$  values were 77.9%, 85.3%, 71.6% and 66.3% for *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *B. thermosphacta* and *Staphylococcus*, respectively.

### 3.4 Reconstruction of target DNA in Lyoner-type sausages

After comparing the results of multiplex qPCRs and cultures obtained from 96 subsamples of fresh and naturally spoiled meat, three independent Lyoner-type sausages with variable ratios of spoiled meat (0%, 5%, 12% and 25%) were produced in-house, at the Chair of Food Safety, LMU Munich (Germany). Culturing was applied for fresh and spoiled meat as well as for raw sausages, whereas the multiplex qPCRs were applied to all types of samples including cooked sausages. The results of both methods were, again, compared using relative accuracy (RA) and additionally t-test analysis (OriginPro 2020, Origin Labs).

Fig. 3 shows the results obtained from culturing ( $\log_{10} \text{ cfu/g}$ ) and from multiplex qPCRs ( $\log_{10} \text{ cfu/g}$  equivalent) of all six sample groups (fresh meat, spoiled meat, sausage with 0%, 5%, 12%, 25% of spoiled meat). For two fresh meat samples and their raw/cooked Lyoner-type sausages (0% spoiled meat), the number of target microorganisms detected by multiplex qPCRs was higher than by cultivation (RA > 130%). In one fresh meat sample all target microorganisms were below the limit of detection, tested by both cultivation and qPCR (RA = 100%). For spoiled meat and raw/cooked Lyoner-type sausages containing 5%, 12% and 25% of spoiled meat, the  $\log_{10} \text{ cfu/g}$  obtained by multiplex qPCR and culture was similar (RA = 90 - 110%). By using t-test analysis, the difference ( $\Delta$ ) of  $\log_{10} \text{ cfu/g}$  between qPCRs and culturing obtained from samples within the same group (six groups, see Fig. 3) was not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

When comparing the different sausage groups using t-test analysis, the detected amounts (both by culturing and by qPCR) of *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *B. thermosphacta* and

*Staphylococcus* were increasing (or at least tended to increase) in sausages containing higher ratios of spoiled meat ( $0\% < 5\% < 12\%$  and  $< 25\%$ , Fig. 3). However, it has to be stated that differences between plate count and qPCR or within the same method lower than  $1 \log_{10} \text{cfu/g}$  could be considered as experimental error. Table S1 (supplementary file) shows the results of t-test analysis between the sausage groups. For the culturing method, the amount of three target bacteria (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and *B. thermosphacta*) in raw sausages containing spoiled meat (5%, 12% and 25%) compared to raw sausages containing only fresh meat were statistically significant ( $p < 0.05$ ). However, there was no statistical difference between raw sausages containing 5% vs. 12% and vs. 25% spoiled meat. For the multiplex qPCRs, only *Pseudomonas* and *B. thermosphacta* in sausages containing spoiled meat (12% and 25%) were statistically different from sausages containing only fresh meat, in both raw and cooked sausages. Regarding the genus *Staphylococcus*, there was no difference between groups of sausages, neither using culturing methods nor multiplex qPCRs.

In order to classify the sausage quality, the guidance and critical values for fresh pork and ground meat (DGHM, 2014) were used as reference values for sausages in this study. In Fig. 3, the red lines are the guidance and critical values, namely 6.0, 5.0 and  $3.5 \log_{10} \text{cfu/g}$  for *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and coagulase positive *Staphylococcus*, respectively. No reference value is available for *B. thermosphacta*. Thus, the value for *B. thermosphacta* was based on the results of fresh and spoiled pork obtained in this study and on the values which were reported to be found in fresh and spoiled beef by Ercolini et al., 2006, Pennacchia et al., 2009 and Russo et al., 2006, namely  $6.0 \log_{10} \text{cfu/g}$ . All Lyoner-type sausage samples (raw and cooked) containing spoiled meat (5%, 12%, 25%) showed contamination levels of all four target bacteria around or above the guidance and critical values, investigated with both multiplex qPCRs and culturing.

The target microorganisms in Lyoner condiment, nitrate pickling salt and cutter aids were quantified using the developed multiplex qPCRs and standard dilutions as described above. The amounts of *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *B. thermosphacta* and *Staphylococcus* in Lyoner condiment were 6.7, 6.9, 5.8 and  $3.4 \log_{10} \text{cfu/g}$  equivalents, respectively. The amount of all target microorganisms in cutter aids and nitrate pickling salt ranged from not detectable to  $3.5 \log_{10} \text{cfu/g}$  equivalent. According to the production of these sausages, 5 g Lyoner condiment were mixed to a total volume of 1000 g sausage. Therefore, numbers of target microorganisms in Lyoner condiment supposed to be found in sausages were 4.4, 4.6, 3.5 and

1.2 log<sub>10</sub> cfu/g for *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *B. thermosphacta* and *Staphylococcus*, respectively. Thus, the high amount of target microorganisms in Lyoner condiment had no quantitative influence on the total amount of investigated bacteria in all sausages, except for one raw/cooked Lyoner-type sausage, which was produced only from fresh meat and where target microorganisms were below the limit of detection.

### 3.5 Quantification of target organisms in commercially available sausages

Thirty “Bologna-type” sausages (in German: Brühwurst, see Section 2.1.2) randomly sampled at retail and butchers in the region of Munich and Southern Bavaria (Germany) were analyzed with the developed multiplex qPCRs. Fig. 4 shows the amounts of all four target microorganisms found in each Brühwurst sample. The average number of target bacteria in all samples (n = 30) was 4.7+0.7 (2.0 - 5.9) log<sub>10</sub> for *Enterobacteriaceae*, 4.2+0.7 (2.8 - 8.4) log<sub>10</sub> for *Staphylococcus*, 5.3+0.7 (3.8 - 6.8) log<sub>10</sub> for *Pseudomonas* and 3.9+1.4 (1.6 - 7.2) log<sub>10</sub> cfu/g for *B. thermosphacta*. Among all target bacterial groups, the amount of *B. thermosphacta* found in samples was very variable. The red lines are the adopted guidance and critical values as described in Section 3.4. Nine samples concerning *Enterobacteriaceae*, four samples concerning *Pseudomonas* and two samples concerning *B. thermosphacta* had contamination levels at or above the guidance and critical values. A total of 25 samples contained *Staphylococcus* above the critical values for fresh pork and ground meat according to DGHM (2014), which is applied for coagulase positive *Staphylococcus*.

A total of 14 samples, marked with blue filling (Fig. 4), contained high values of either *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, or both species in quantities higher or only slightly below the guidance and critical values. They were categorized as suspicious samples regarding the microbial contamination of meat or of other components used for sausage production. Suspicious samples tested for *B. thermosphacta* and *Staphylococcus* are also marked in blue in order to present the complexity of microorganisms in each sample.

## 4 Discussion

The quantification of *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *B. thermosphacta* and *Staphylococcus* in fresh meat, spoiled meat and raw sausages using the developed multiplex qPCRs provided similar results to the culturing method, and was later successfully applied to cooked sausages in this study. Fresh meat is generally not sterile and contaminated with microorganisms. It contains variable amounts of bacteria from not detectable ( $< 2.0$ ) up to  $5.8 \log_{10}$  for *Pseudomonas*,  $< 2.0$  to  $4.0 \log_{10}$  for *Enterobacteriaceae*,  $< 2.0$  to  $6.3 \log_{10}$  for *B. thermosphacta* and about  $2.0$  to  $6.0 \log_{10}$  cfu/g for *Staphylococcus* (this study; Al-Tarazi et al., 2009; Ercolini et al., 2006; Li et al., 2014; Pennacchia et al., 2009; Pennacchia et al., 2011; Russo et al., 2006; Shale et al., 2005). According to the European Regulation No. 178/2002, meat containing a high number of undesirable bacteria is classified as spoiled and is not allowed to be further processed for human consumption either as a fresh or a heated product. During storage of meat, spoilage microorganisms grow continuously and can reach growth plateaus which are above the guidance and critical values for fresh and ground meat, e.g.  $6.0$ ,  $5.0$  and  $3.5 \log_{10}$  cfu/g for *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and coagulase positive *Staphylococcus*, respectively (DGHM, 2014). For *B. thermosphacta*, the defined guidance value of  $6.0 \log_{10}$  cfu/g in this study is a summarized result from various studies. Although the counts of *B. thermosphacta* found in fresh pork and fresh beef were very variable, all meat samples stored aerobically and classified as spoiled contained this species  $> 6.0 \log_{10}$  cfu/g (this study; Ercolini et al., 2006; Pennacchia et al., 2009; Russo et al., 2006).

In this study, the growth of *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae* was not influenced by temperature conditions and apparently not by the growth of other microorganisms or the level of meat spoilage. Both bacterial groups reached their maximal counts at a similar level of  $9.0 - 10.0 \log_{10}$  cfu/g, independent of their initial contamination and storage temperatures. Similar results were also observed in other studies (such as Bruckner et al., 2012; Ercolini et al., 2006; Giannuzzi et al., 1998; Koutsoumanis, 2001; Li et al., 2014; Pennacchia et al., 2011 and Seydim et al., 2006). *Pseudomonas* and some psychrotrophic *Enterobacteriaceae*, such as *Serratia liquefaciens* and *Proteus vulgaris*, can produce protease to break down the myosin of meat (Belák et al., 2011; Losantos et al., 2000; Signorini et al., 2007; Wickramasinghe et al., 2019), thus they can compete better with other bacteria in meat to gain their own nutrient for their metabolism. In this study, both bacterial groups were identified as the main spoilage microorganisms of pork meat under aerobic conditions. Unlike Gram-negative *Pseudomonas*

and *Enterobacteriaceae*, the growth curve of Gram-positive *B. thermosphacta* and *Staphylococcus* depended on the initial contamination levels and their growth plateau was variable between 6.0 and 10.0 log<sub>10</sub> cfu/g. Many strains of *B. thermosphacta* and *Staphylococcus* found in food could produce none or very few protease enzymes, thus they may not be able to compete with proteolytic bacteria such as *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae*, as described above (Casaburi et al., 2015; Ruaro et al., 2013; Signorini et al., 2003). This could be an explanation as to why the growth stagnation of *B. thermosphacta* was observed in some samples in this study and in the studies of Jiang et al. (2010) and Pennacchia et al., (2011). Additionally, high loads of competitive microorganisms such as growth of *Pseudomonas* (Doulgeraki and Nychas, 2013; Ercolini et al., 2006) and lactic acid bacteria could inhibit the growth of *B. thermosphacta* (Russo et al., 2006). According to the results, the involvement of *Staphylococcus* in spoilage of meat is still unclear and until now, there are no reports which allow comparison with the results of the present study. Their growth stagnation may be caused by similar factors as described for *B. thermosphacta*.

In order to detect these four target microorganisms in heat-treated meat products, two multiplex qPCRs were developed in this study. The sensitivity (100%), specificity (99 - 100%) and the limit of quantification (2.0 - 3.0 log<sub>10</sub> cfu/g of each microorganism) were deemed to be sufficient for further application in meat samples. The analysis of applicability of the developed multiplex qPCRs compared to the standard culturing method was performed using fresh and spoiled meat samples (n = 96). There were samples of which the values obtained from culture were higher than from qPCR, especially in some heavily spoiled meat samples from day 2, 3 and day 4 stored at 22 °C and from day 20 stored at 4 °C. This could be due to PCR inhibitors produced by rotten meat and/or due to an inhibitory influence of a high load of background microorganisms (Pennacchia et al., 2009; Taylor et al., 2005; Wolffs et al., 2004). Although the matrix effects were tested in this study and no significant difference was observed among four types of matrices (sodium chloride, irradiated meat, meat moderately spoiled for two days and raw sausage), the condition of moderately spoiled meat may not represent the exact condition of strongly spoiled meat. In our opinion, the differences of qPCRs and cultures > -1.0 log<sub>10</sub> cfu/g are acceptable, since qPCRs can detect inactivated microorganisms. All in all, percentages of samples with an acceptable applicability of multiplex qPCR were 77.9% for *Pseudomonas*, 85.3% for *Enterobacteriaceae*, 71.6% for *B. thermosphacta* and 66.3% for *Staphylococcus*.



The developed multiplex qPCRs were further applied to inhouse-produced Lyoner-type sausages and their raw materials. Spice (Lyoner condiment) was found to be highly contaminated with target microorganisms but had no or only little influence on the total quantity of target bacteria in almost all Lyoner-type sausages. Two fresh meat samples were found to be highly contaminated with target microorganisms by multiplex qPCRs, whereas the culturable cells were much lower. This could be due to the fact that fresh meat samples were frozen for two days before they were thawed and used for sausage production, so parts of the target bacteria probably died, which led to a lower culturable number of target bacteria. For spoiled meat and raw/cooked Lyoner-type sausages containing 5%, 12% and 25% of spoiled meat, the  $\log_{10}$  cfu/g obtained from multiplex qPCRs and culture were similar (RA = 90 - 110%). Additionally, by using t-test analysis, no statistically significant difference was observed between multiplex qPCRs and culture applied to the same samples (except boiled sausages, of which no cultures were made). Therefore, the results showed a similar applicability of multiplex qPCRs and culture. After treatment with heat, the detected amounts of target bacteria were slightly decreasing compared to raw sausages, however not statistically significant by t-test. Additionally, their RA of  $97.2\% \pm 6.8$  was in the optimal range. Therefore, a combination of homogenization techniques with a food mixer followed by a stomacher, which was applied for all Bologna-type sausages, was found to be an optimal sample preparation technique to achieve the highest possible amount of DNA extract.

By using t-test analysis to compare the sausage groups tested with the same methods, the statistical difference depended on the amount of bacteria in fresh meat (variable, up to  $6.0 \log_{10}$ ) and the level of spoiled meat (generally  $> 8.0 \log_{10}$  cfu/g), quantified either by culture or qPCR. In this study, if spoiled meat contained  $1 \times 10^8$  cfu/g and fresh meat contained  $1.0 - 5.0 \times 10^6$  cfu/g, sausages containing 5%, 12% and 25% spoiled meat, should consequently contain  $5 \times 10^6$ ,  $1.2 \times 10^7$  and  $2.5 \times 10^7$  cfu/g, respectively. The differences were within the same log level, and may not be significantly displayed by either culturing method or qPCR. However, as found in both cultures and multiplex qPCRs in this study, the differences in the amounts of *Pseudomonas* and *B. thermosphacta* in sausages containing 12% and 25% spoiled meat and sausages containing only fresh meat, were statistically significant. If the amount of bacteria in fresh meat was very low (e.g.  $< 5.0 \log_{10}$ ), the statistical difference may also be found for sausages containing fresh meat and sausages containing 5% spoiled meat, as found by using the cultural method. According to the results of t-test analysis, *Pseudomonas* and

*B. thermosphacta* should be considered as indicators for spoiled meat being used in the sausage production process.

Apart from the statistical analysis as described above, in terms of food safety and food quality, a quantitative result of each food sample has to be evaluated individually by comparing to the provided guidance and critical values. For Lyoner-type sausages containing spoiled meat (5%, 12% and 25%), the amounts of three target organisms (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and *B. thermosphacta*) were above the guidance and critical values (6.0, 5.0 and 6.0 log<sub>10</sub> cfu/g, respectively) for the same samples measured by both methods as described above. The critical value for *Staphylococcus* (3.5 log<sub>10</sub> cfu/g, DGHM, 2014) applies to coagulase positive strains, while the multiplex qPCR used in this study was able to detect most of *Staphylococcus* species independently of their ability to produce coagulase. Consequently, all Lyoner-type sausages seemingly contained *Staphylococcus* above the critical values established only for coagulase positive staphylococci such as *S. aureus*. Similar results were obtained from culture, since all *Staphylococcus*-like colonies were counted without differentiation between coagulase positive or negative. Therefore, the findings of culturing and molecular signals higher than the critical value for coagulase positive staphylococci in this study, do not represent a potential risk for human consumption.

For Bologna-type sausages sampled at retail/butchers, 14 of 30 samples had a contamination level of *Pseudomonas* and/or *Enterobacteriaceae* around or above the guidance and critical values and were thus preliminary classified as suspicious. The amount of *B. thermosphacta* in each Bologna-type sample from retail/butchers was very variable, but only 2 of 14 suspicious samples showed values above the defined guidance values in this study. The contamination levels of *Staphylococcus* in these products were as variable as the contamination levels of *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae*. Because the numbers of *Staphylococcus* in individual samples had no relation to both main spoilage species, it might be interesting to further investigate if these *Staphylococcus* originated from the environment of processing plants. According to all the results, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and *B. thermosphacta* play an important role in meat spoilage and the high amount of at least one of these species may indicate the use of spoiled meat in the production process of sausages. Additionally, a molecular biological method to detect coagulase positive staphylococci such as *S. aureus* should be further established since its heat-stable enterotoxins are an important aspect of Food Safety (Kadariya et al., 2014; Le Loir et al., 2003 Nychas et al., 2008). For products

identified as “suspicious”, further investigations are required to clarify whether the presence of the bacteria was a result of recontamination after heating or if they were originally in/on the meat and/or in other ingredients.

## 5 Conclusion

In total, 15 pork samples and 12 inhouse-made Lyoner-type sausages containing variable ratios of spoiled meat (0%, 5%, 12% and 25%) were used to demonstrate the applicability of two new multiplex qPCR methods. Both were successfully used as a rapid and reliable method to quantify the original microbial contamination in heat-treated meat products regarding three spoilage microorganisms (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and *B. thermosphacta*) and one environmental bacterium (*Staphylococcus*). Furthermore, 30 Bologna-type sausages from retail and randomly chosen butchers were exemplarily investigated with these multiplex qPCRs. The results showed that there are some suspicious samples occurring in retail and provided evidence, that some sausages may have been produced using meat contaminated with bacterial levels above the guidance and critical values. Consequently, the developed multiplex qPCRs of this study can help to detect possible cases of Food Fraud and thus may be supportive tools to improve consumer protection.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108932>.

## Acknowledgment

This work was financially supported by the Bavarian Research Foundation (Bayerische Forschungsstiftung, Germany, grant number AZ-1250-16), by TUEV SUED ELAB GmbH (Siegen, Germany) and by the company Rational AG (Landsberg am Lech, Germany). Thanks to the butchers: Stocker Hofpfisterei GmbH, Landfrau in Emmering, Max in Hof and Moser in Landsberg am Lech (Germany) for providing fresh meat for natural meat spoilage experiments and production of inhouse-made sausages. Additionally, extra thanks to Ms. Sophie Ba-Trung, Ms. Judith Wiedemann and all the technical assistants, especially Ms. Barbara Fritz, Ms. Verena Hohenester and Ms. Ilona Fitzek, from the Chair of Food Safety, LMU Munich (Germany) for their excellent laboratory work.

## References

- Al-Tarazi, Y. H., Albetar, M. A., Alaboudi, A. R. (2009) Biotyping and enterotoxigenicity of *Staphylococci* isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. *Food Res. Int.* 42, 374-379
- Beck, A., Dylla, R., Geißlinger, M., Jakob, H., Liebl, B., Lücke, F.K. (2008), Leitfaden - Herstellung von Öko-Fleisch- und ÖkoWurstwaren ohne oder mit reduziertem Einsatz von Pökelfstoffen, [https://orgprints.org/14275/2/14275-06OE007-fibl-beck-2008-poekelstoffe\\_leitfaden.pdf](https://orgprints.org/14275/2/14275-06OE007-fibl-beck-2008-poekelstoffe_leitfaden.pdf), last access: 23.6.2020
- Belák, Á., Kovács, M., Hermann, Z., Holczman, Á., Márta, D., Stojakovič, S., Bajcsi, N., Maráz, A. (2011) Molecular analysis of poultry meat spoiling microbiota and heterogeneity of their proteolytic and lipolytic enzyme activities. *Acta Aliment.* 40, 3-22
- Borch, E., Kant-Muermans, M.-L., Blixt, Y. (1996) Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 103-120
- Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B., Kreyenschmidt, J. (2012) Influence of cold chain interruptions on the shelf life of fresh pork and poultry. *Int. J. Food Sci. Technol.* 47, 1639-1646
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G.-J., Villani, F., Ercolini, D. (2015) Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiol.* 45, 83-102
- DGHM (2014) Microbiological guidelines for food, a recommendation from a professional group for food microbiology and hygiene, German Society for Hygiene and Microbiology (German: Mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln, eine Empfehlung der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene, Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie: DGHM), Beuth Verlag GmbH, Berlin, Germany.
- Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G.-J. E. (2012) Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 130-141
- Doulgeraki, A. I., Nychas, G.-J. E. (2013) Monitoring the succession of the biota grown on a selective medium for pseudomonads during storage of minced beef with molecular-based methods. *Food Microbiol.* 34, 62-69
- European Regulation (EC) No 178/2002 (2002) of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety
- EFSA: European Food Safety Authority (2016) Growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat. *EFSA J.* 14, 4523
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., Villani, F. (2006) Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4663-4671
- Ercolini, D., Russo, F., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F. (2007) Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis* and *P. putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the *carA* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2354
- Ercolini, D., Casaburi, A., Nasi, A., Ferrocino, I., Di Monaco, R., Ferranti, P., Mauriello, G., Villani, F. (2010) Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. *Int. J. Food Microbiol.* 142, 120-131
- Giannuzzi, L., Pinotti, A., Zaritzky, N. (1998) Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 101-110
- Gribble, A., Brightwell, G. (2013) Spoilage characteristics of *Brochothrix thermosphacta* and *campestris* in chilled vacuum packaged lamb, and their detection and identification by real time PCR. *Meat Sci.* 94, 361-368
- Jiang, Y., Gao, F., Xu, X. L., Su, Y., Ye, K. P., Zhou, G. H. (2010) Changes in the bacterial communities of vacuum-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR-DGGE. *Meat Sci.* 86, 889-895
- Kadariya, J., Smith, T., Thapaliya, D. (2014) *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed. Res. Int.* 2014
- Kameník, J. (2013) The microbiology of meat spoilage: a review. *Maso International J. Food. Sci. Technol.* 2013, 1-9

- Koutsoumanis, K. (2001) Predictive modeling of the shelf life of fish under nonisothermal conditions. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1821
- Labadie, J. (1999) Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Sci.* 52, 299-305
- Landeta, G., Curiel, J. A., Carrascosa, A. V., Muñoz, R., De Las Rivas, B. (2013) Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from Spanish dry cured meat products. *Meat Sci.* 93, 387-396
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *GMR* 2, 63-76
- Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, last amendment 17.04.2019, [https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/\\_Ernaehrung/Lebensmittel-Kennzeichnung/LeitsaetzeFleisch.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=2](https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Ernaehrung/Lebensmittel-Kennzeichnung/LeitsaetzeFleisch.pdf?__blob=publicationFile&v=2), last access 17.06.2020
- Lemmon, G. H., Gardner, S. N. (2008) Predicting the sensitivity and specificity of published real-time PCR assays. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 7, 18
- Li, M., Tian, L., Zhao, G., Zhang, Q., Gao, X., Huang, X., Sun, L. (2014) Formation of biogenic amines and growth of spoilage-related microorganisms in pork stored under different packaging conditions applying PCA. *Meat Sci.* 96, 843-848
- Losantos, A., Sanabria, C., Cornejo, I., Carrascosa, A. V. (2000) Characterization of *Enterobacteriaceae* strains isolated from spoiled dry-cured hams. *Food Microbiol.* 17, 505-512
- Martín, B., Jofré, A., Garriga, M., Pla, M., Aymerich, T. (2006) Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by real-time PCR. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6040
- Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., Koutsoumanis, K. P. (2008) Meat spoilage during distribution. *Meat Sci.* 78, 77-89
- Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., Stratev, D. (2020) Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2020, 1-21
- Osman, K., Badr, J., Al-Maary, K. S., Moussa, I. M. I., Hessain, A. M., Girah, Z. M. S. A., Abo-Shama, U. H., Orabi, A., Saad, A. (2016) Prevalence of the antibiotic resistance genes in coagulase-positive and negative-*Staphylococcus* in chicken meat retailed to consumers. *Front. Microbiol.* 7, 1846
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Villani, F. (2009) Development of a real-time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled raw meat. *Int. J. Food. Microbiol.* 134, 230-236
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Villani, F. (2011) Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiol.* 28, 84-93
- Pin, C., García de Fernando, G. D., Ordóñez, J. A. (2002) Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4441
- Ruaro, A., Andrighetto, C., Torriani, S., Lombardi, A. (2013) Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. *Food Microbiol.* 34, 106-111
- Russo, F., Ercolini, D., Mauriello, G., Villani, F. (2006) Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. *Food Microbiol.* 23, 797-802
- Seydim, A. C., Acton, J. C., Hall, M. A., Dawson, P. L. (2006) Effects of packaging atmospheres on shelf-life quality of ground ostrich meat. *Meat Sci.* 73, 503-510
- Shale, K., Lues, J. F. R., Venter, P., Buys, E. M. (2005) The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. *Food Microbiol.* 22, 433-438
- Signorini, M., Ponce-Alquicira, E., Guerrero-Legarreta, I. (2007) Proteolytic and lipolytic changes in beef inoculated with spoilage microorganisms and bioprotective lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Prop.* 6, 147-163
- Stellato, G., La Storia, A., De Filippis, F., Borriello, G., Villani, F., Ercolini, D. (2016) Overlap of spoilage-associated microbiota between meat and the meat processing environment in small-scale and large-scale retail distributions. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4045-4054
- Taylor, T. M., Elhanafi, D., Drake, M., Jaykus, L.-A. (2005) Effect of food matrix and cell growth on PCR-based detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J. Food. Prot.* 68, 225-232

Wickramasinghe, N. N., Ravensdale, J., Coorey, R., Chandry, S. P., Dykes, G. A. (2019) The predominance of psychrotrophic pseudomonads on aerobically stored chilled red meat. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18, 1622-1635

Wolffs, P., Knutsson, R., Norling, B., Rådström, P. (2004) Rapid Quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1042

## Tables and figure legends

**Table 1: Microorganisms for validation of the specificity and sensitivity of multiplex qPCRs**

Microbial group	Species
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter freundii</i> *, <i>Enterobacter cloacae</i> *, <i>Erwinia persicina</i> **, <i>Escherichia coli</i> *, <i>Hafnia alvei</i> *, <i>Klebsiella oxytoca</i> **, <i>Klebsiella pneumoniae</i> *, <i>Kluyvera ascorbata</i> **, <i>Pantoea agglomerans</i> **, <i>Pectobacterium carotovorum</i> **, <i>Proteus mirabilis</i> *, <i>Rahnella aquatilis</i> **, <i>Salmonella Enteritidis</i> *, <i>Serratia proteamaculans</i> **, <i>Shigella sonnei</i> *, <i>Yersinia intermedia</i> **
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> *, <i>S. capitis</i> **, <i>S. epidermidis</i> *, <i>S. equorum</i> **, <i>S. haemolyticus</i> **, <i>S. hominis</i> **, <i>S. hyicus</i> *, <i>S. intermedius</i> *, <i>S. pseudintermedius</i> *, <i>S. saprophyticus</i> **, <i>S. succinus</i> **, <i>S. warneri</i> **, <i>S. xylosus</i> **
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *, <i>P. fluorescens</i> *, <i>P. fragi</i> *, <i>P. lundensis</i> *, <i>P. putida</i> *
<i>Brochothrix</i>	<i>Brochothrix thermosphacta</i> */**(2 strains)
Lactobacillales	<i>Carnobacterium divergens</i> **, <i>Car. maltaromaticum</i> **, <i>Leuconostoc citreum</i> **, <i>Leu. mesenteroides</i> **, <i>Enterococcus faecalis</i> *, <i>Ent. faecium</i> *, <i>Ent. hirae</i> **, <i>Ent. mundtii</i> **, <i>Lactobacillus agilis</i> **, <i>Lac. curvatus</i> **, <i>Lac. fuchuensis</i> **, <i>Lac. plantarum</i> **, <i>Lac. sakei</i> **, <i>Lac. versmoldensis</i> **, <i>Lactococcus vividescens</i> , <i>Streptococcus infantis</i> **, <i>Str. oralis</i> **, <i>Str. sanguinis</i> **
Other bacteria	<i>Acinetobacter pittii</i> **, <i>Arthrobacter castelli</i> **, <i>Bacillus cereus</i> *, <i>Bac. licheniformis</i> **, <i>Brevibacterium casei</i> **, <i>Clostridium estertheticum</i> *, <i>Clos. perfringens</i> *, <i>Micrococcus luteus</i> *, <i>Rhodococcus hoagii</i> * <i>Solibacillus silvestris</i> **
Yeasts	<i>Candida zeylanoides</i> *, <i>Debaromyces hansenii</i> *, <i>Kazachstania psychrophila</i> *, <i>Rhodotorula glutinis</i> **, <i>Yarrowia deformans</i> *

\* Species provided by the German collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany)

\*\* Species originating from various food samples (meat, sausages, musk melon) isolated in-house at the Chair of Food Safety, Ludwig Maximilian University (LMU) of Munich, Germany and identified to species level by MALDI-TOF MS

**Table 2: Bacterial species for establishing a standard curve for multiplex qPCRs**

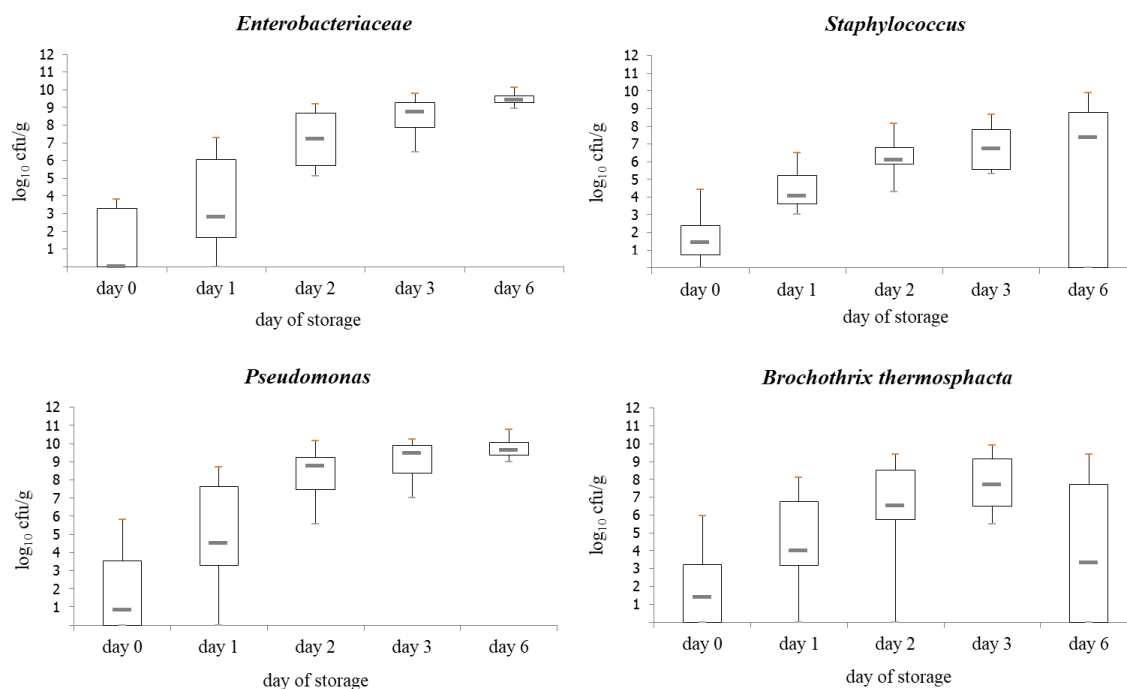
Bacterial group	Species	Source*
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039
	<i>Hafnia alvei</i>	DSM 30079
	<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 788
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DSM 1798
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	DSM 20459
	<i>Staphylococcus intermedius</i>	DSM 20373
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1128
	<i>Pseudomonas lundensis</i>	DSM 6252
	<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291
<i>Brochothrix</i>	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	DSM 20171
	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Chair of Food Safety, LMU

\*DSM: The reference species are from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ); Chair of Food Safety, LMU: Isolated from ground meat (pork) and confirmed by MALDI-TOF MS

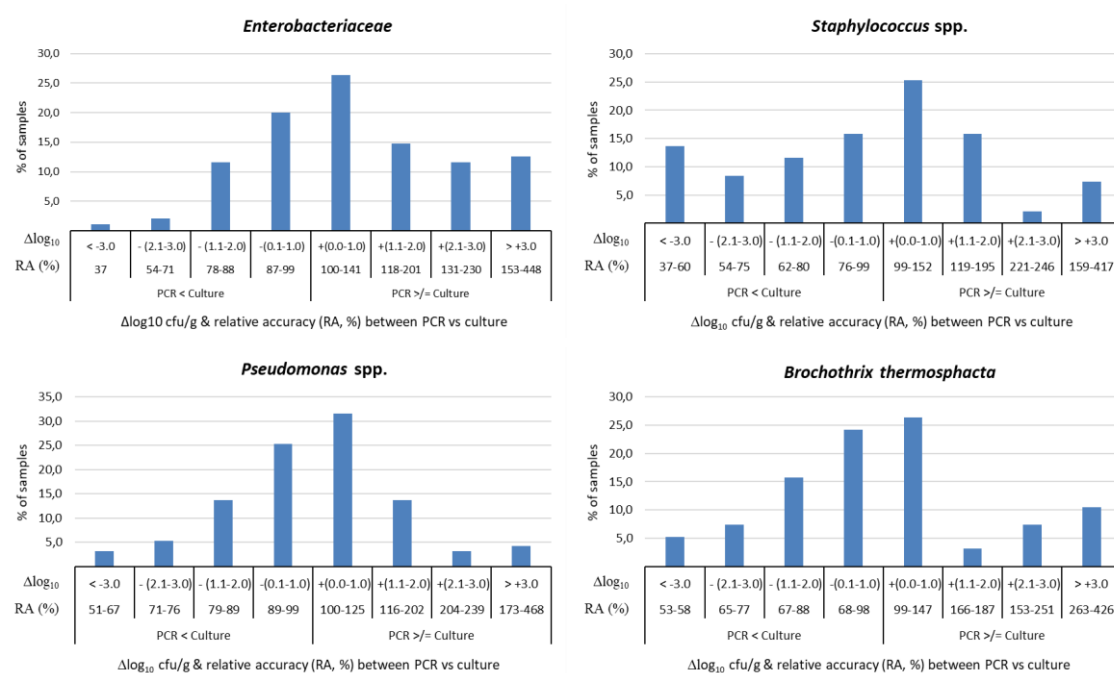


**Table 3: Multiplex qPCRs with primers and probes used for detection and quantification of the bacterial target groups**

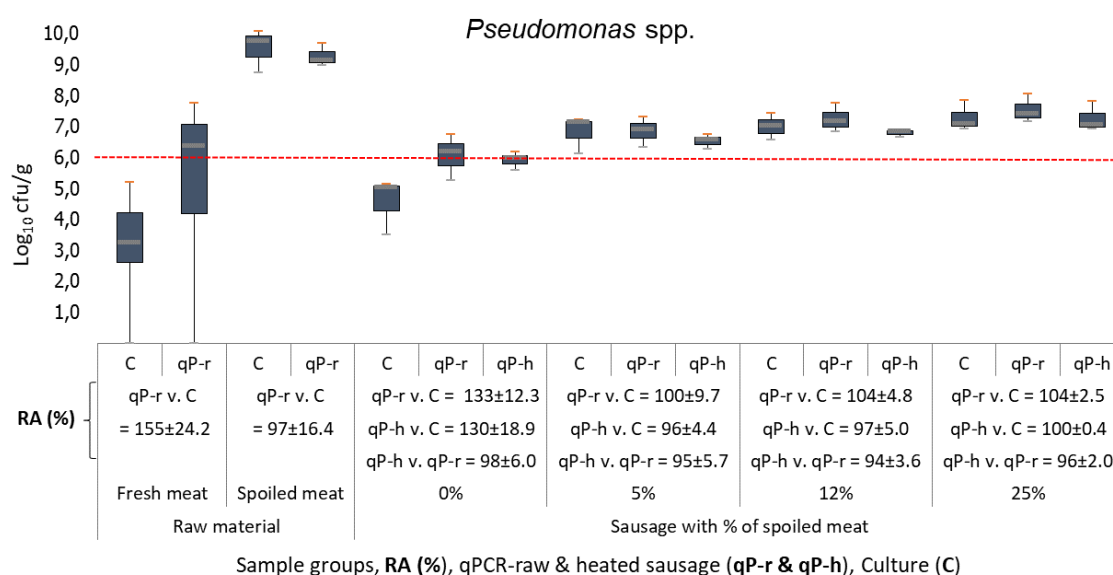
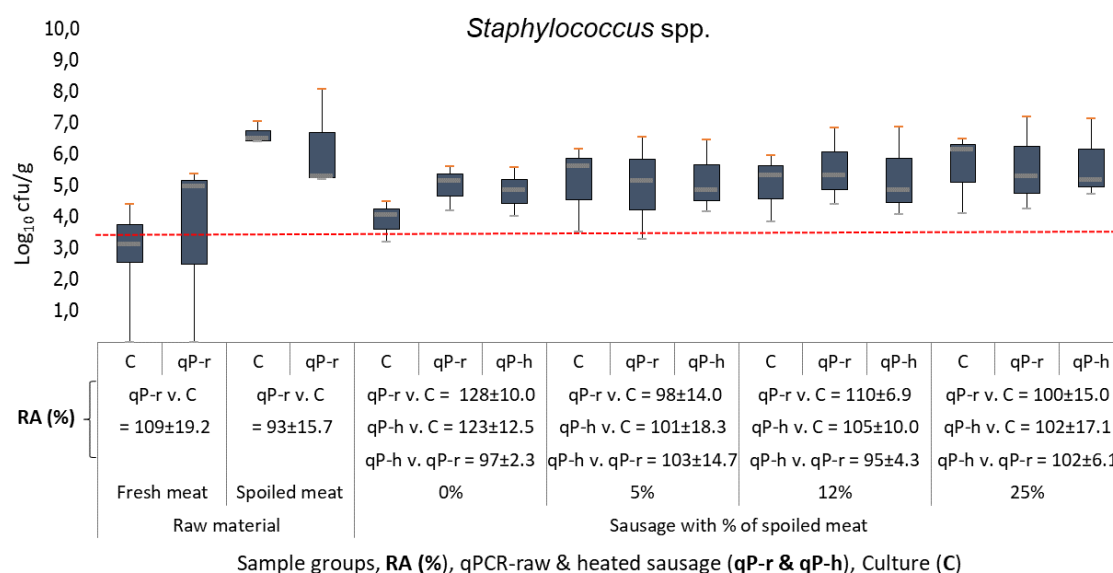
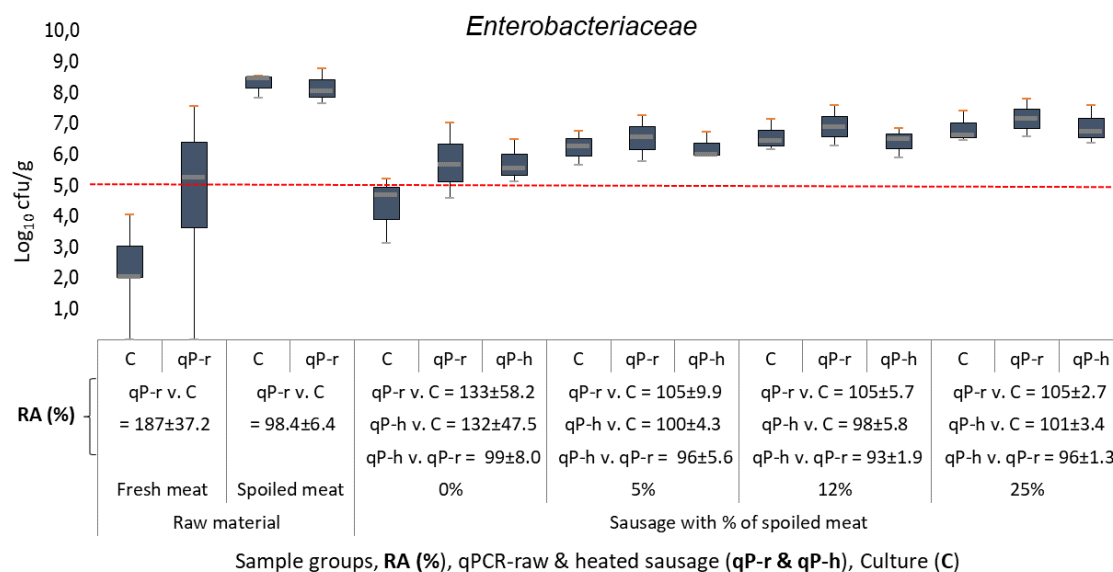
Multiplex qPCR	Specificity	Primers and probes	Sequence (direction 5'-3')	Fragment length
1	<i>Enterobacteriaceae</i>	Eb 707-F	ATCTGGAGGAATACCGGTGG	359 bp
		Eb 1066-R	CAACATTTACAACACGAGCTG	
		Eb 848-Cy5	Cy5-CGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGT-BHQ2	
	<i>Staphylococcus</i> spp.	Staph 123-F	TGGATAACCTACCTATAAGACTG	290 bp
		Staph 413-R	ATCCGAAGACCTTCATCACTC	
		Staph 151-Hex	Hex-ACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACC-BHQ1	
		Staph 154-Hex	Hex-CCGGGAAACCGGGGCTAATGC-BHQ1	
2	<i>Pseudomonas</i> spp.	Pseu 658-F	AGAGGGTGGTGGAAATTCCTG	75 bp
		Pseu 733-R	TCAGTGTCAGTATCAGTCCAGG	
		Pseu 694-Cy3.5	Cy3.5-GTAGATATAGGAAGGAACACCACTG-BHQ2	
	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Bro 70-F	ACGGATAAAGAGCTTGCTCTTTTG	211 bp
		Bro 281-R	TCGGCTATGGATCGTCGCCT	
		Bro 157-FAM	FAM-AGAAATCGATGCTAATACCGAATGTGCTG-BHQ1	



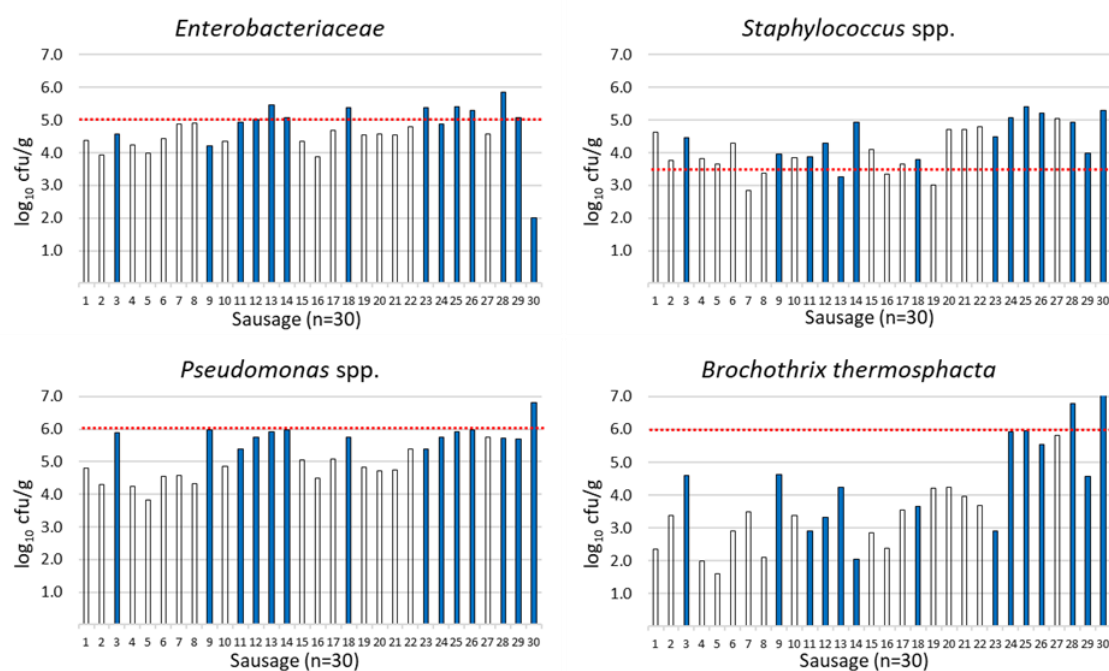
**Fig. 1:** Box whisker plots are showing growth behavior of four target microorganisms (cfu/g) on meat ( $n = 12$ ) stored at 22 °C for six days, determined by cultivation. Lines above and below the box plots are maximal and minimal values of the dataset. The boxes indicate ranges between the median of the lower and upper half of the dataset. The bars within the boxes are the median values of all samples.



**Fig. 2:** Bar charts showing distribution of samples according to their  $\Delta\log_{10}$  cfu/g and relative accuracy (RA, in percentage) between multiplex qPCRs and culturing obtained from a total of 96 subsamples of fresh and naturally spoiled meat.





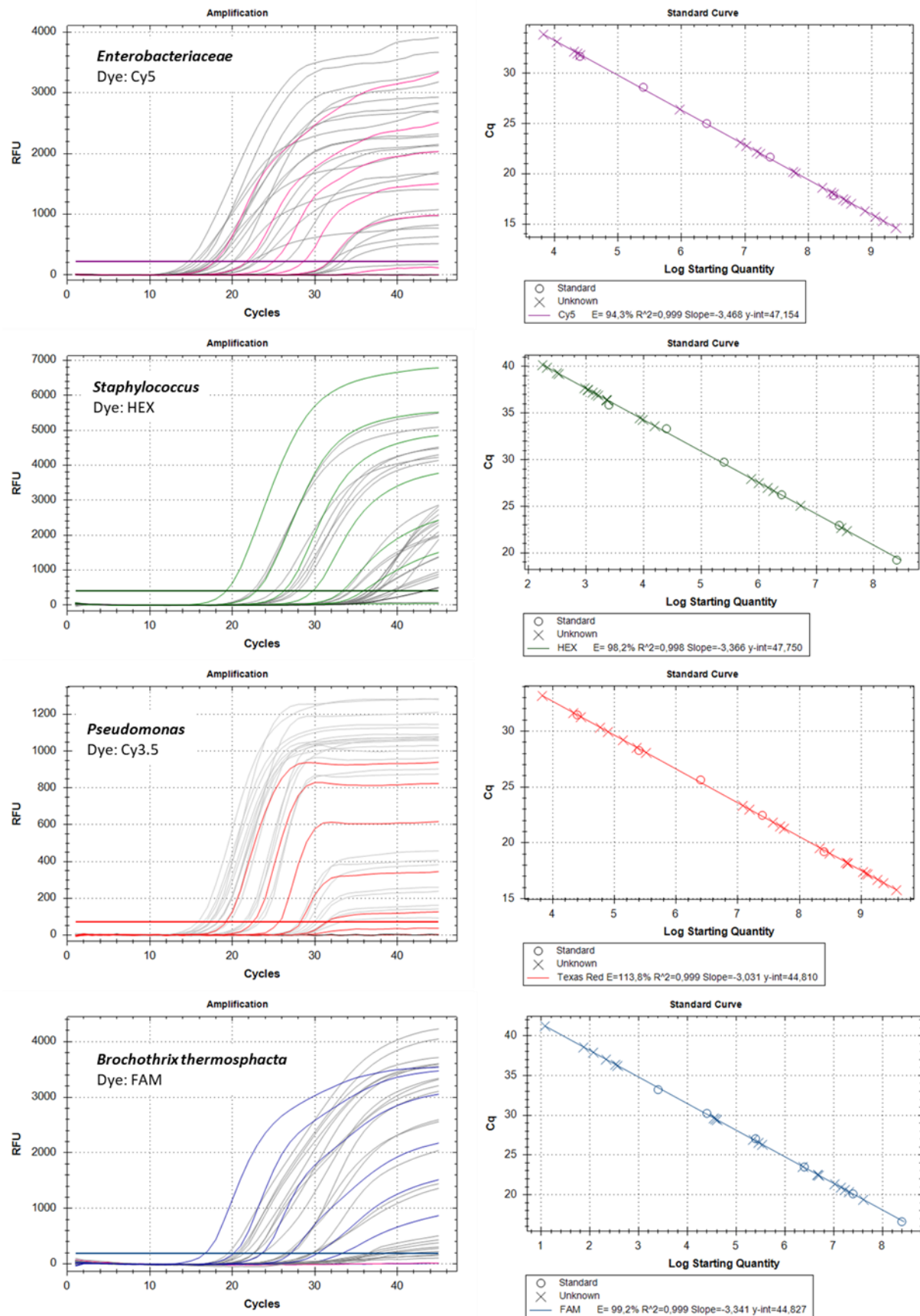


**Fig. 4:** Results of multiplex qPCRs obtained from 30 Bologna-type sausages. Red lines (----) are guidance and critical values adopted for products in this study. Bars with blue filling were considered as suspicious samples according to the high contamination with *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae*. The slope and PCR efficiencies (%) of the standard curve of each bacterial group were -3.56 and 90.8% for *Enterobacteriaceae*, -3.55 and 91.2% for *Staphylococcus*, -3.24 and 103.3% for *Pseudomonas* and -3.43 and 95.6% for *B. thermosphacta*.

## Supplementary Data

**Table S1:** Results of *t*-test analysis by comparing between sausage groups (containing 0%, 5%, 12% and 25% spoiled meat) using the same quantification methods.  $P < 0.05$  = statistically significant (marked with color).

Bacterial group	% Spoiled meat	Culture-raw sausages			qPCR-raw sausages			qPCR-cooked sausages		
		5%	12%	25%	5%	12%	25%	5%	12%	25%
<i>Pseudomonas</i>	0%	0.011	0.007	0.005	0.099	0.040	0.021	0.500	0.005	0.007
	5%		0.357	0.186		0.185	0.074		0.005	0.007
	12%			0.250			0.238			0.088
<i>Enterobacteriaceae</i>	0%	0.028	0.016	0.011	0.202	0.110	0.073	0.500	0.112	0.047
	5%		0.237	0.119		0.268	0.158		0.112	0.047
	12%			0.285			0.324			0.173
<i>B. thermosphacta</i>	0%	0.043	0.035	0.024	0.094	0.052	0.041	0.500	0.003	0.004
	5%		0.481	0.321		0.146	0.052		0.003	0.004
	12%			0.206			0.224			0.085
<i>Staphylococcus</i>	0%	0.127	0.099	0.059	0.497	0.272	0.284	0.500	0.330	0.185
	5%		0.479	0.342		0.336	0.335		0.330	0.185
	12%			0.305			0.482			0.363



**Fig. S1:** Example of the fluorescence signals and standard curves of four target bacterial groups for multiplex qPCRs. For *Pseudomonas*, the dye Cy3.5 has the same fluorophore channel as the dye Texas-Red.





## 5 Diskussion

### 5.1 Wachstum der Zielkeime auf verdorbenem Fleisch

Die Komplexität und die Menge an initialen Mikroorganismen auf frischem Fleisch werden vom Schlachtprozess und den nachfolgenden Verarbeitungsschritten beeinflusst (Nychas et al., 2008; Schwaiger et al., 2012). Die anfängliche mikrobielle Kontamination des Fleisches, die Temperatur und die Lageratmosphäre haben großen Einfluss auf das Wachstum und die Zusammensetzung der Verderbsmikrobiota von Fleisch (Gill und Newton, 1978).

Vier bakterielle Gruppen (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *B. thermosphacta* und *Staphylococcus*) wurden aufgrund ihrer Präsenz in Lebensmitteln und ihrer Relevanz in den Bereichen Fleischhygiene und Fleischverderb als Zielkeime für diese Studie ausgewählt. In den vorliegenden kulturellen Untersuchungen von frischem und verdorbenem Fleisch dieser Studie wurde die Auswahl bestätigt.

Frisches Fleisch ist nicht steril sondern mit Mikroorganismen kontaminiert, auch wenn diese nicht mittels Kultur oder molekularbiologischer Methoden, wie beispielsweise PCR, detektiert werden können, da der Kontaminationslevel häufig unterhalb der Nachweisgrenze liegt (Ercolini et al., 2006; Li et al., 2014; Pennacchia et al., 2011). Trotzdem wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit und in Übereinstimmung mit anderen Studien, in frischem Fleisch eine variable Anzahl an Bakterien gefunden, welche von nicht nachweisbar ( $< 2,0 \log_{10}$ ) bis zu  $5,8 \log_{10}$  KbE/g für *Pseudomonas* (diese Studie; Ercolini et al., 2006; Pennacchia et al., 2011),  $< 2,0$  bis zu  $4,0 \log_{10}$  KbE/g für *Enterobacteriaceae* (diese Studie; Ercolini et al., 2006; Li et al., 2014; Russo et al., 2006),  $< 2,0$  bis  $6,3 \log_{10}$  KbE/g für *B. thermosphacta* (diese Studie; Ercolini et al., 2006; Pennacchia et al., 2011; Russo et al., 2006) und  $2,0$  bis  $6,0 \log_{10}$  KbE/g für *Staphylococcus* (diese Studie; Al-Tarazi et al., 2009; Shale et al., 2005) betrug.

*Pseudomonas* sind Gram-negative Bakterien, die die Verderbsmikrobiota von aerob gelagertem Fleisch dominieren (Gill und Newton, 1978). Dies wurde auch im Rahmen dieser Studie bestätigt.

Die Familie der Gram-negativen *Enterobacteriaceae* spielt hauptsächlich dann eine Rolle beim Fleischverderb, wenn die Kühlkette nicht eingehalten wurde (Nychas et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden *Enterobacteriaceae* sowohl in kühl gelagertem verdorbenem Fleisch nachgewiesen als auch in verdorbenem Fleisch, das bei Raumtemperatur gelagert

wurde. Deren Anzahl war jedoch in dem verdorbenen Fleisch, das bei Raumtemperatur gelagert wurde, höher und wurde schneller erreicht.

*B. thermosphacta* ist ein Gram-positives Bakterium, das auf Fleisch wachsen kann, welches entweder aerob oder anaerob oder in MA gelagert wird (Gribble und Brightwell, 2013; Pennacchia et al., 2009; Pin et al., 2002). Sein Wachstum wird hauptsächlich mit dem Verderb von frischem Fleisch und Fleischprodukten in Verbindung gebracht (Borch et al., 1996; Pennacchia et al., 2009). Auch in der hier vorliegenden eigenen Studie wurde *B. thermosphacta* regelmäßig auf frischem Fleisch nachgewiesen. Während des Verderbsprozesses kam es jedoch im Vergleich zu *Pseudomonas* oder *Enterobacteriaceae* zu einem variableren Anstieg in der Keimzahl.

Gram-positive Staphylokokken sind vornehmlich auf frischem Fleisch vorhanden, wobei die Spezies *S. aureus* aufgrund seiner hitzestabilen Enterotoxine eine wichtige Rolle für die Lebensmittelsicherheit spielt (Dainty und Mackey, 1992; Le Loir et al., 2003; Nychas et al., 2008). Außerdem ist das Vorkommen Methicillin-resistenter *S. aureus* auf Fleisch ein zentrales Thema im Bereich Public Health (Bernier-Lachance et al., 2020). In der eigenen Arbeit wurde zudem das Vorkommen von *Staphylococcus* auf verdorbenem, aerob gelagertem Fleisch nachgewiesen.

Die Wachstumskurve der Zielkeime (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *B. thermosphacta* und *Staphylococcus*) in den natürlich verdorbenen Fleischproben (n = 12) wurde mittels Kultur ermittelt und analysiert. *Pseudomonas* und *Enterobacteriaceae* wurden dabei in dieser Studie als die Hauptverderbserreger von Schweinefleisch unter aeroben Lagerungsbedingungen identifiziert.

Das Wachstum der beiden Bakteriengruppen wurde weder von der Lagerungstemperatur (4 °C oder 22 °C), noch von dem Wachstum anderer Mikroorganismen oder dem Verderbsgrad des Fleisches beeinflusst. *Pseudomonas* und *Enterobacteriaceae* erreichten ihre Maximalwerte auf einem ähnlichen Niveau von 9,0 - 10,0 log<sub>10</sub> KbE/g, unabhängig von der Lagertemperatur und ihrer anfänglichen Konzentration (< 2,0 bis 6,0 log<sub>10</sub> KbE/g beziehungsweise < 2,0 bis 4,0 log<sub>10</sub> KbE/g). Von ähnlichen Ergebnissen berichten auch andere Studien (Bruckner et al., 2012b; Ercolini et al., 2006; Giannuzzi et al., 1998; Koutsoumanis, 2001; Li et al., 2014; Pennacchia et al., 2011; Seydim et al., 2006).

*Pseudomonas* und psychrotrophe *Enterobacteriaceae*, wie *Serratia* spp., sind in der Lage, Proteasen zu produzieren, die das Myosin des Fleisches auflösen (Fox et al., 1989; Signorini et

al., 2007; Wickramasinghe et al., 2019). Diese Fähigkeit trägt dazu bei, im Konkurrenzkampf mit anderen Bakterien einen Vorteil zu erlangen und an Nährstoffe für den eigenen Stoffwechsel zu gelangen.

Anders als die Wachstumskurven der Gram-negativen *Pseudomonas* und *Enterobacteriaceae*, waren die der Gram-positiven *B. thermosphacta* und *Staphylococcus* von ihrem jeweiligen anfänglichen Kontaminationslevel abhängig. Deren Wachstumsplateau lag zwischen 6,0 - 10,0 log<sub>10</sub> KbE/g.

Casaburi et al. (2014) kommen in einer Studie zu dem Schluss, dass *B. thermosphacta* nicht von der Fleischmikrobiota beeinflusst wird. Im Gegensatz hierzu ergab die hier vorliegende Studie den Einblick, dass *B. thermosphacta* beim fortschreitenden Fleischverderb oftmals im Wachstum stagniert, was mit den Ergebnissen von Jiang et al. (2010) und Pennacchia et al. (2011) übereinstimmt.

Einige Stämme von *B. thermosphacta* und *Staphylococcus*, die aus Lebensmitteln isoliert wurden, können keine oder wenig Protease produzieren. Daher könnten *B. thermosphacta* und *Staphylococcus* gegenüber den Protease-produzierenden *Pseudomonas* und *Enterobacteriaceae* im Nachteil und unfähig sein, sich gegen diese zu behaupten (Casaburi et al., 2014; Ruaro et al., 2013; Signorini et al., 2007). Dieser Aspekt könnte eine Erklärung dafür sein, dass in der hier vorliegenden Studie und den Studien von Jiang et al. (2010) und Pennacchia et al. (2011) in manchen Proben eine Stagnation des Wachstums von *B. thermosphacta* beobachtet wurde.

Ein anderer Grund für den Wachstumsstillstand von *B. thermosphacta* könnte die stark vorhandene Begleitmikrobiota im verdorbenen Fleisch sein (Drosinos und Board, 1995; Russo et al., 2006). Zudem führt eine große Anzahl an Milchsäurebakterien in verdorbenem Fleisch zu einem pH-Wert Abfall, was sich negativ auf das Wachstum von *B. thermosphacta* auswirkt (Russo et al., 2006).

Die Wachstumskurve von *Staphylococcus* verhielt sich ähnlich zu derjenigen von *B. thermosphacta*, mit maximalen Keimzahlen in verdorbenem Fleisch von 5,0 - 10,0 log<sub>10</sub> KbE/g. Die Stagnation im Wachstum könnte an denselben Ursachen liegen wie für *B. thermosphacta* beschrieben. Staphylokokken sind Bewohner von Haut und Schleimhäuten von Menschen und Säugetieren (Byrd et al., 2018; Rho et al., 2001). Zwar wurden einige

Spezies wie *S. xylosus*, *S. succinus* und *S. pasteurii* von frischem und gekühltem rohen Fleisch isoliert (Doulgeraki et al., 2012; Ercolini et al., 2006; Nychas et al., 2008), jedoch scheinen sich Staphylokokken nicht ausschließlich an Fleisch als ökologische Nische angepasst zu haben. Ihre Beteiligung am Fleischverderb ist bislang unklar und es gibt keine Studien, die einen Vergleich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit dieser Studie erlauben.

Fleisch, das eine hohe Anzahl an unerwünschten Mikroorganismen enthält, wird als verdorben angesehen. Es ist verboten, verdorbenes Fleisch für den menschlichen Verzehr in den Verkehr zu bringen, unabhängig davon ob es roh oder verarbeitet ist (VO (EG) Nr. 178/2002). Mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln sind von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie veröffentlicht. Diese Richtwerte informieren über produktspezifische Mikroorganismen und akzeptable Keimbelastungen bei guter Herstellungs- und Hygienepaxis (DGHM, 2018a).

Wird ein Richtwert durch Verderbserreger überschritten, für die es keine Warnwerte gibt, müssen weitere Kriterien wie sensorische Eigenschaften zur Beurteilung des Lebensmittels herangezogen werden (DGHM, 2018a). Bei Überschreiten der Warnwerte werden die Grundsätze der guten Hygiene- und Herstellungspraxis verletzt und im Falle pathogener Mikroorganismen ist eine Gesundheitsgefährdung der Verbraucher möglich (DGHM, 2018a).

Während des Fleischverderbs wachsen Verderbserreger kontinuierlich und können Wachstumsplateaus erreichen, die über den Warn- und Richtwerten der DGHM für frisches Fleisch und Hackfleisch liegen, wie  $6,0 \log_{10}$  KbE/g für *Pseudomonas*,  $5,0 \log_{10}$  KbE/g für *Enterobacteriaceae* und  $3,5 \log_{10}$  KbE/g für koagulasepositive *Staphylococcus* (DGHM, 2014b). *B. thermosphacta* ist in den Richt- und Warnwerten der DGHM nicht aufgeführt, daher wurde in dieser Studie der Wert von  $6,0 \log_{10}$  KbE/g als Richtwert festgelegt. Dieser Wert wurde auf Grundlage mehrerer Studien gewählt: Obwohl die Anzahl von *B. thermosphacta* auf frischem Schweine- und Rindfleisch zwischen  $< 2,0$  und  $6,3 \log_{10}$  KbE/g variierte, enthielten alle aerob gelagerten, für verdorben befundenen Fleischproben einen Gehalt von  $> 6,0$  KbE/g an *B. thermosphacta* (Ercolini et al., 2006; Pennacchia et al., 2009; Russo et al., 2006).

## 5.2 Entwicklung der Multiplex qPCRs

Ziel dieser Studie war es, eine Methode zu entwickeln, um das Vorkommen von Verderbserregern in erhitzten Fleischprodukten nachzuweisen. Kulturelle Methoden gelten als Goldstandard, um Bakterien in Lebensmitteln nachzuweisen und zu quantifizieren. Für den Nachweis von Rekontaminationen nach der Herstellung erhitzter Fleischprodukte können diese Methoden angewandt werden. Jedoch kann mittels Kultur nicht der ursprüngliche mikrobielle Zustand der verwendeten, rohen Ausgangsmaterialien ermittelt werden, da die überwiegende Zahl der lebensmittelrelevanten Mikroorganismen durch Erhitzung abgetötet wird.

Daher sind andere diagnostische Werkzeuge nötig, um die ursprüngliche Mikrobiota evaluieren zu können. Mittels quantitativer PCR (qPCR) ist es möglich, die hitzestabile DNA zu detektieren und darüber Art und Anzahl der Zielkeime als „koloniebildende Einheiten pro Gramm äquivalent“ (KbE/g äquivalent) zu quantifizieren.

Aufgrund der in 4.1. beschriebenen Kriterien wurden vier Keimgruppen (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *B. thermosphacta* und *Staphylococcus*) als Zielkeime für die Entwicklung zweier multiplex qPCRs ausgewählt. Die beiden multiplex qPCRs wurden mit insgesamt vier spezifischen Primerpaaren und fünf Sonden entwickelt, um die Zielkeime in erhitzten Fleischprodukten zu detektieren und zu quantifizieren.

Die Primer und Sonden wurden anhand eines Sequenzabgleichs des 16S rRNA Genabschnitts zwischen den Zielkeimgruppen und anderen Fleisch- und Umweltbakterien (n = 205) entwickelt, die in der Genbank (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) bereitgestellt werden. Die Sensitivität und Spezifität der Primer und Sonden wurde anhand der DNA-Extrakte von diversen Mikroorganismen (n=68 Spezies und 69 Stämme, siehe Tabelle 7) evaluiert.

Die 68 Spezies beinhalten sowohl Bakterien und Hefen der Mikrobiota von frischem und verdorbenem Fleisch als auch ubiquitär vorkommende Keime und pathogene Erreger, die regelmäßig auf Fleisch zu finden sind.

**Tabelle 6:** Multiplex qPCRs mit Primern und Sonden für die Detektion und Quantifizierung der Zielkeime

Multiplex qPCR	Spezifität	Primer und Sonden	Sequenz (5' - 3')	Fragmentlänge in Basenpaaren
1	<i>Enterobacteriaceae</i>	Eb707-F	ATCTGGAGGAATACCGGTGG	359
		Eb1066-R	CAACATTTCAACACGAGCTG	
		Eb848-Cy5	Cy5-CGTGGCTCCGGAGCTAACGCGT-BHQ2	
	<i>Staphylococcus</i> spp.	Staph123-F	TGGATAACCTACCTATAAGACTG	290
		Staph413-R	ATCCGAAGACCTTCATCACTC	
		Staph151-Hex	Hex-ACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACC-BHQ1	
		Staph154-Hex	Hex-CCGGGAAACCGGGGCTAATGC-BHQ1	
2	<i>Pseudomonas</i> spp.	Pseu658-F	AGAGGGTGGTGGAATTCCTG	75
		Pseu733-R	TCAGTGTCAGTATCAGTCCAGG	
		Pseu694-Cy3.5	Cy3.5-GTAGATATAGGAAGGAACACCACTG-BHQ2	
	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Bro70-F	ACGGATAAAGAGCTTGCTCTTTG	211
		Bro281-R	TCGGCTATGGATCGTCGCCT	
		Bro157-FAM	FAM-AGAAATCGATGCTAATACCGAATGTGCTG-BHQ1	

**Tabelle 7:** Mikroorganismen für die Validierung der Spezifität und Sensitivität der Multiplex qPCRs

Keimgruppe	Spezies
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter freundii</i> *, <i>Enterobacter cloacae</i> *, <i>Erwinia persicina</i> **, <i>Escherichia coli</i> *, <i>Hafnia alvei</i> *, <i>Klebsiella oxytoca</i> **, <i>Klebsiella pneumoniae</i> *, <i>Kluyvera ascorbata</i> **, <i>Pantoea agglomerans</i> **, <i>Pectobacterium carotovorum</i> **, <i>Proteus mirabilis</i> *, <i>Rahnella aquatilis</i> **, <i>Salmonella Enteritidis</i> *, <i>Serratia proteamaculans</i> **, <i>Shigella sonnei</i> *, <i>Yersinia intermedia</i> **
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> *, <i>S. capitis</i> **, <i>S. epidermidis</i> *, <i>S. equorum</i> **, <i>S. haemolyticus</i> **, <i>S. hominis</i> **, <i>S. hyicus</i> *, <i>S. intermedius</i> *, <i>S. pseudintermedius</i> *, <i>S. saprophyticus</i> **, <i>S. succinus</i> **, <i>S. warneri</i> **, <i>S. xylosus</i> **
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *, <i>P. fluorescens</i> *, <i>P. fragi</i> *, <i>P. lundensis</i> *, <i>P. putida</i> *
<i>Brochothrix</i>	<i>Brochothrix thermosphacta</i> */**(2 Stämme)
Lactobacillales	<i>Carnobacterium divergens</i> **, <i>Car. maltaromaticum</i> **, <i>Leuconostoc citreum</i> **, <i>Leu. mesenteroides</i> **, <i>Enterococcus faecalis</i> *, <i>Ent. faecium</i> *, <i>Ent. hirae</i> **, <i>Ent. mundtii</i> **, <i>Lactobacillus agilis</i> **, <i>Lac. curvatus</i> **, <i>Lac. fuchuensis</i> **, <i>Lac. plantarum</i> **, <i>Lac. sakei</i> **, <i>Lac. versmoldensis</i> **, <i>Lactococcus vividescens</i> , <i>Streptococcus infantis</i> **, <i>Str. oralis</i> **, <i>Str. sanguinis</i> **
Andere Bakterien	<i>Acinetobacter pittii</i> **, <i>Arthrobacter castelli</i> **, <i>Bacillus cereus</i> *, <i>Bac. licheniformis</i> **, <i>Brevibacterium casei</i> **, <i>Clostridium estertheticum</i> *, <i>Clos. perfringens</i> *, <i>Micrococcus luteus</i> *, <i>Rhodococcus hoagii</i> * <i>Solibacillus silvestris</i> **
Hefen	<i>Candida zeylanoides</i> *, <i>Debaryomyces hansenii</i> *, <i>Kazachstania psychrophila</i> *, <i>Rhodotorula glutinis</i> **, <i>Yarrowia deformans</i> *

\*Spezies aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland)

\*\*Spezies aus verschiedenen Lebensmittelproben (Fleisch, Wurst, Zuckermelone), isoliert am Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München, Deutschland und identifiziert auf Speziesebene mittels MALDI-TOF MS

Alle Primer-Sonden-Kombinationen wiesen eine Sensitivität von 100 % und somit eine hohe richtig-positiv-Rate ohne falsch-negative Ergebnisse auf. In der Studie von Lemmon und Gardner (2008) wird offensichtlich, dass PCR-Assays oftmals mangelhafte Sensitivitäten aufweisen. Den Grund dafür sehen Lemmon und Gardner (2008) in der PCR-Entwicklung auf Grundlage konservierter Genregionen, ohne dabei die Variationen der Zielregionen in



Betracht zu ziehen.

In der Vergangenheit hat sich jedoch das Wissen um die bakterielle Genetik stetig erweitert und in Gendatenbanken sind zahlreiche DNA-Sequenzen frei zugänglich. Die Sensitivität der qPCRs in dieser Studie liegt nun bei 100 %. Zudem wurden spezifische Primerpaare und spezifische Sonden für die jeweiligen Zielkeime entwickelt, die im Vergleich zu der Verwendung von universal auf alle Bakterien anwendbare Primern eine höhere Sensitivität erzielen können.

Die Spezifität der Primer und Sonden lag bei 100 % für *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* und *B. thermosphacta*. Das qPCR System für den Nachweis von *Staphylococcus* wies eine Spezifität von 99 % auf, da eine der beiden *Staphylococcus*-Sonden auch leicht an das 16S rRNA Gen von *Bacillus cereus* bindet. Jedoch liegt der Ct-Wert bei einer Bakterienkonzentration von  $10^7$  KbE/ml für *Bacillus cereus* bei über 36,0; bei *Staphylococcus* liegt der Ct-Wert hingegen zwischen 19,2 und 20,2 PCR-Zyklen. Aufgrund der hohen Ct-Werte von *Bacillus cereus* und der Tatsache, dass *Bacillus cereus* beim Verderbsprozess von Fleisch keine Rolle zu spielen scheint, kann dieser falsch-positive Wert vernachlässigt werden.

Die Nachweisgrenzen der qPCRs für die Zielkeime, ermittelt durch Standardkurven, betragen  $2,5 \times 10^3$  KbE/g für *Pseudomonas* und *Enterobacteriaceae* und  $2,5 \times 10^2$  KbE/g für *B. thermosphacta* und *Staphylococcus*. Zwar sind die Nachweisgrenzen für *Pseudomonas* und *Enterobacteriaceae* eine Log-Stufe höher als diejenigen für *B. thermosphacta* und *Staphylococcus*, jedoch erreichten die beiden zuerst genannten Keimgruppen die höchsten Keimzahlen in den Verderbsexperimenten. Nur drei von 96 Proben, ausgenommen die Proben ohne jegliches Wachstum, wiesen Werte unterhalb der Nachweisgrenze für *Pseudomonas* auf. Dies macht eine höhere Nachweisgrenze für *Pseudomonas* und *Enterobacteriaceae* im Vergleich zu *B. thermosphacta* und *Staphylococcus*, die in niedrigeren Konzentrationen vorkamen, akzeptabel.

Die Nachweisgrenzen für *B. thermosphacta* und *Staphylococcus* sind zufriedenstellend. Diese Keime wurden häufig in frischem Fleisch nachgewiesen (Nychas et al., 2008; Pennacchia et al., 2009), bei dem eine geringere Anzahl zu erwarten ist und daher eine niedrige Nachweisgrenze ( $2,5 \times 10^2$  KbE/g) für deren Nachweis benötigt wird.

Ein Grund für höhere Nachweisgrenzen könnte sein, dass das Multiplex qPCR-Assay jeweils zwei Bakteriengruppen simultan nachweist und daher für das PCR-Programm ein Kompromiss

in der Annealing-Zeit und -Temperatur, die für die jeweiligen Bakterien optimal wären, gefunden werden muss.

Auch fällt auf, dass die beiden Gram-negativen Vertreter *Pseudomonas* und *Enterobacteriaceae* höhere Nachweisgrenzen haben. Es könnte daher für das Erreichen einer niedrigeren Nachweisgrenze erwogen werden, eine andere DNA-Extraktionsmethode zu wählen, die als effektiv für Gram-negative Keime bestätigt wurde (McOrist et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit stellten sich die Paarungen *Enterobacteriaceae* + *Staphylococcus* (Multiplex qPCR 1) und *Pseudomonas* + *B. thermosphacta* (Multiplex qPCR 2) aufgrund niedrigerer Nachweisgrenzen und intensiveren Fluoreszenzsignalen der qPCRs als jeweils beste Kombination heraus. Dabei werden jeweils ein Gram-positiver mit einem Gram-negativen Zielkeim kombiniert, weshalb ein universell anwendbares DNA-Extraktionskit verwendet wurde.

Bei der DNA-Extraktion gestaltet sich die Zell-Lysis von Gram-positiven Keimen aufgrund ihrer Peptidoglykan-Schicht innerhalb der Zellwand schwieriger als bei Gram-negativen Keimen (Litzinger und Mayer, 2010; Ulrich und Hughes, 2001). In der eigenen Studie weisen die Gram-positiven Keime dagegen eine niedrigere Nachweisgrenze auf. Eine Ursache dafür könnte sein, dass das verwendete DNA-Extraktionskit durch einen zusätzlichen Schritt, der eine vorausgehende Lysozym-Inkubation beinhaltet, ergänzt wurde, um die Effizienz der DNA-Extraktion für Gram-positive Keime zu erhöhen. Das Enzym Lysozym spaltet Mucokomplex-Polymere und kann somit die Zellwand Gram-positiver Keime auflösen (Jawetz et al., 2013).

Neben den genannten Aspekten, die die Nachweisgrenzen beeinflussen können, muss zudem die Güte der Primer wie beispielsweise deren Sequenzlänge, Basenreihenfolge und Schmelztemperatur bedacht werden. Unterschiede innerhalb der Spezifität oder Konzentration der Primer können die Ausbeute einer PCR deutlich beeinflussen (Konrad und Busch, 2010), was zu unterschiedlichen Nachweisgrenzen führen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Primer aus Gründen der praktischen Handhabung für die Routinediagnostik jeweils in derselben Konzentration verwendet. Um die Nachweisgrenze für den jeweiligen Zielkeim zu erhöhen, könnten die Konzentrationen von Primer und Sonden der Multiplex qPCRs entsprechend optimiert werden. Dieser Schritt ist aufwendig und wurde nicht näher verfolgt, da die Nachweisgrenze der Zielkeime zwischen  $2,5 \cdot 10^2$  und  $2,5 \cdot 10^3$  KbE/g für den Zweck dieser Studie ausreichen, wie bereits oben beschrieben.

Auch die Anzahl des bakteriellen 16S rRNA Gens, das als Zielsequenz der qPCRs in dieser Studie dient, könnte eine Rolle in Bezug auf unterschiedliche Nachweisgrenzen spielen. Die rRNA Gene sind oftmals auf einem Operon zusammen gelagert, von welchem es mehrere Kopien pro Bakterienzelle gibt (Stoddard et al., 2015).

Vergleicht man die Anzahl dieser Operone von Vertretern der vier Zielkeimgruppen dieser Studie (Tabelle 8), so fällt auf, dass *B. thermosphacta* die höchste Anzahl an Kopien der rRNA Operone aufweist und gleichzeitig die Multiplex qPCR für diesen Keim eine niedrigere Nachweisgrenze ( $2,5 \cdot 10^2$  KbE/g) im Vergleich zu *Pseudomonas* und *Enterobacteriaceae* (jeweils  $2,5 \cdot 10^3$  KbE/g) erreicht. Auch Vertreter der Familie der Staphylokokken besitzen weniger Kopien des rRNA Operons im Vergleich zu *B. thermosphacta*. Allerdings ist die Nachweisgrenze für *Staphylococcus* gleich hoch wie für *B. thermosphacta*. Dies könnte daran liegen, dass sich Staphylokokken traubenförmig zusammen lagern (Gatermann und Miksits, 2009) und daher im Vergleich zu der komplexen Morphologie von *B. thermosphacta* (Rattanasomboon et al., 1999; vergleiche Abschnitt 2.2.2.1) mehr Bakterienzellen pro Kolonie aufweisen könnten.

**Tabelle 8:** Anzahl der Kopien des 16S rRNA Gens.

Quelle: <https://rrndb.umms.med.umich.edu>

Keimgruppe	Spezies	Anzahl der Kopien des 16S rRNA Gens
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	4
	<i>P. lundensis</i>	7
	<i>P. putida</i>	5-8
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	8
	<i>Hafnia alvei</i>	7-8
	<i>Proteus mirabilis</i>	7
<i>Brochothrix</i>	<i>B. thermosphacta</i>	9
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>	5-6
	<i>S. hyicus</i>	6
	<i>S. aureus</i>	4-6

### 5.3 Vergleich zwischen Kultur und Multiplex qPCRs

Um die Anwendbarkeit der entwickelten Multiplex qPCRs im Vergleich zu kulturellen Methoden zu evaluieren, wurden frische und verdorbene Schweinefleischproben ( $n = 96$ ) verwendet. Zwei Vergleichsmethoden, der Unterschied ( $\Delta$ ) der  $\log_{10}$  KbE/g und die „relative accuracy“ (RA), wurden dafür angewandt. Werte von  $\Delta \log_{10}$  KbE/g nahe 0 und RA-Werte nahe 100 % deuten auf eine hohe Ähnlichkeit der Ergebnisse beider Werte hin. Unterschiede von  $\Delta \pm 1,0 \log_{10}$  KbE/g wurden als akzeptabel bewertet.

Bei einigen Proben (siehe Abbildungen 1- 4) waren die mittels Kultur ermittelten Werte höher als diejenigen der qPCR. Dies war vor allem bei stark verdorbenen Proben von Tag 2, 3 und 6, gelagert bei 20 °C, der Fall. Ein Grund dafür könnten PCR-Inhibitoren im verdorbenen Fleisch sein (Wolffs et al., 2004). Zwar wurden in dieser Studie Matrixeffekte getestet und dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Matrices (Natriumchlorid, bestrahltes Fleisch, leicht verdorbenes Fleisch von Tag 2 und rohe Wurst) festgestellt, jedoch repräsentiert die Matrix von leicht verdorbenem Fleisch nicht die Konditionen von stark verdorbenem Fleisch. Eine DNA-Aufreinigung oder eine Filtration der DNA vor der PCR um die PCR-Inhibitoren zu minimieren (Rodríguez-Lázaro et al., 2004) könnten Optionen sein, um die Ausbeute der PCR zu erhöhen. Dies hätte jedoch auch einen höheren Zeitaufwand zur Folge.

Auch eine hohe Anzahl von Begleitkeimen im Fleisch kann einen hemmenden Effekt ausüben, was in niedrigeren Werten der qPCRs im Vergleich zur Kultur resultiert (Pennacchia et al., 2009). Eine Verdünnung der Proben vor der DNA-Extraktion und anschließender qPCR wäre ein Ansatz, um diesen Effekt zu minimieren.

Die Wahl des Baird-Parker-Agars ist eine weitere Komponente, die die vergleichsweise höheren Werte der Kultur für den Nachweis von *Staphylococcus* erklären könnte. Bei der Auswertung der Baird-Parker-Agarplatten wurde mittels MALDI-TOF MS bestätigt, dass auch die Gattungen *Micrococcus* und *Macrococcus* auf diesem Agar wachsen. Beide Gattungen stellten sich als schwarze, kleine ( $\leq 1$  mm im Durchmesser) Kolonien dar und wurden für die Quantifizierung von *Staphylococcus* nicht mitgezählt, da nur Kolonien mit einer Größe von  $> 1$  mm berücksichtigt wurden. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass trotzdem Kolonien von *Micrococcus* oder *Macrococcus*, die nahezu 1 mm Durchmesser hatten, fälschlicherweise als *Staphylococcus* gehalten wurden. Dies könnte eine Erklärung für die größere Menge an

detektierten *Staphylococcus* mittels Kultur im Vergleich zur qPCR sein, da die beiden Sonden Staph 151 und Staph 154 spezifisch für *Staphylococcus* sind.

Erstaunlicherweise wurde in dieser Studie, wie unter 4.2. beschrieben, eine niedrigere Nachweisgrenze für die Gram-positiven Zielkeime im Vergleich zu den Gram-negativen festgestellt, obwohl Erstere im Vergleich zu Gram-negativen Bakterien eine robustere Zellwand haben, die für die DNA-Extraktion aufgespalten werden muss (Cremonesi et al., 2006; Ulrich und Hughes, 2001).

Die robustere Zellwand könnte jedoch eine Rolle beim Vergleich zwischen Kultur und qPCR der zwei Gram-positiven Zielkeime spielen, wenn die Werte derselben Probe bei der kulturellen Untersuchung höher ausfallen als bei der qPCR. Allerdings wurden die Proben, wie schon in 4.2. erwähnt, vor der DNA-Extraktion mit Lysozym inkubiert, was die Effizienz der Zell-Lysis, vor allem bei Gram-positiven Bakterien, erhöht (Boström et al., 2004; Jawetz et al., 2013). Daher ist die Rolle einer robusteren Zellwand Gram-positiver Keime in dieser Studie vernachlässigbar.

Andererseits gab es auch Proben, deren Werte für die jeweiligen Zielkeime, ermittelt durch die qPCRs, höher waren als die der Kultur (siehe Abbildungen 1 - 4 ). Ein Grund dafür liegt in der Tatsache, dass die PCR DNA von sowohl lebendigen als auch toten Bakterienzellen amplifiziert. Dies ist für den Nachweis bakterieller DNA in erhitzten Wurstwaren essenziell, da mithilfe der entwickelten qPCRs eine Rekonstruktion des ursprünglichen Bakteriengehalts der Rohware erfolgen soll und keine Risikobeurteilung des erhitzten Lebensmittels. Da die kulturelle Untersuchung hierbei an ihre Grenzen kommt, stellen die qPCRs deren Ergänzung für die Beurteilung der Keimbelastung der Ausgangsprodukte dar.

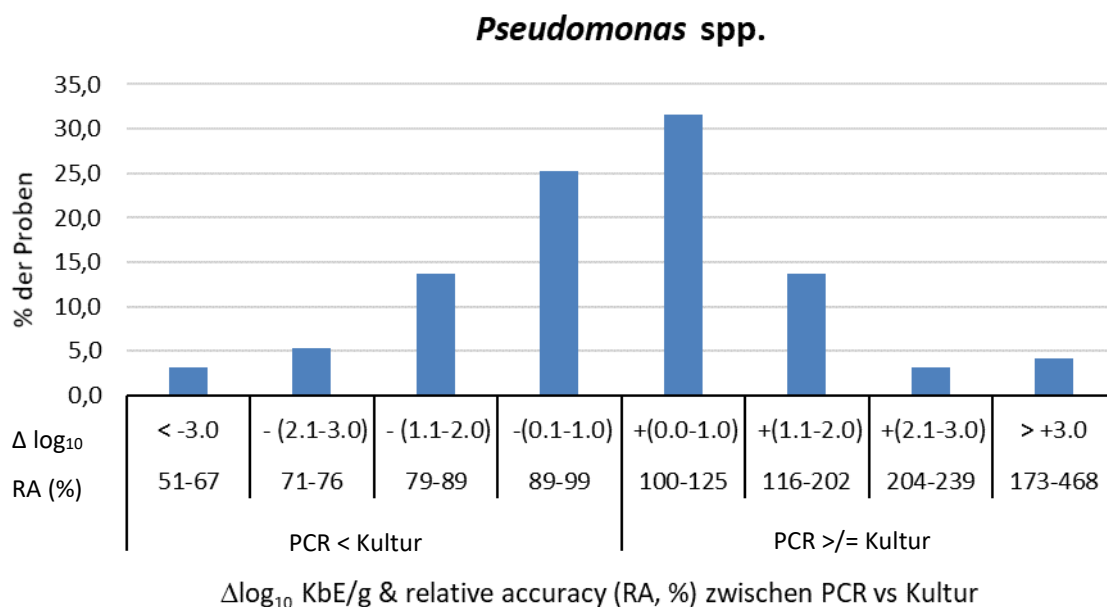
Anwendungsfehler wie ungenügende Homogenisierung vor dem Ausplattieren, falsche Bebrütungskonditionen, zu kurze Bebrütungsdauer der Agarplatten oder Fehler im Auswerten und Berechnen der KbE/g können in dieser Studie aufgrund strenger interner Kontrollen ausgeschlossen werden.

Hohe Werte der Relative Accuracy sind erstrebenswert, insbesondere wenn pathogene Keime untersucht werden, um falsch negative Ergebnisse der qPCR auszuschließen (De Cesare et al., 2014). Von hohen RA- Werten (89,1 % bis 116,2 %) wurde in der Studie von Rodríguez-Lázaro et al. (2004) berichtet, bei der die Proben mit einer bestimmten Konzentration von

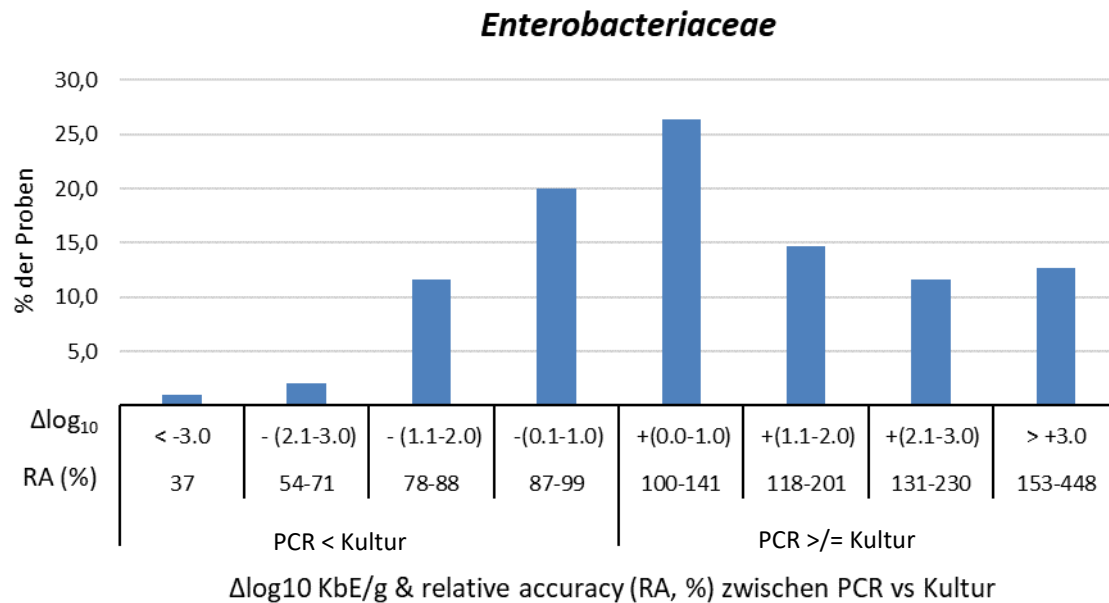
*L. monocytogenes* (KbE/g Probe) künstlich kontaminiert wurden. De Cesare et al. (2014) erreichten RA-Werte zwischen 69,1% und 79,2% für *L. monocytogenes* in natürlich kontaminierten Proben. Die Autoren der Studie bewerteten diese RA-Werte als gut, da die Proben natürlich kontaminiert waren und die Konditionen den realen Bedingungen bei Lagerung und Transport von Fleisch entsprachen, was die Ergebnisse sowohl der Kultur als auch der PCR unterschiedlich beeinflussen kann (De Cesare et al., 2014).

In der Studie von Pennacchia et al. (2009) wurden die Proben vor der DNA-Extraktion mit Propidium Monoazid behandelt, um keine toten Bakterienzellen zu detektieren. Somit wurden RA-Werte von 56,7% bis maximal 101,9 % erreicht.

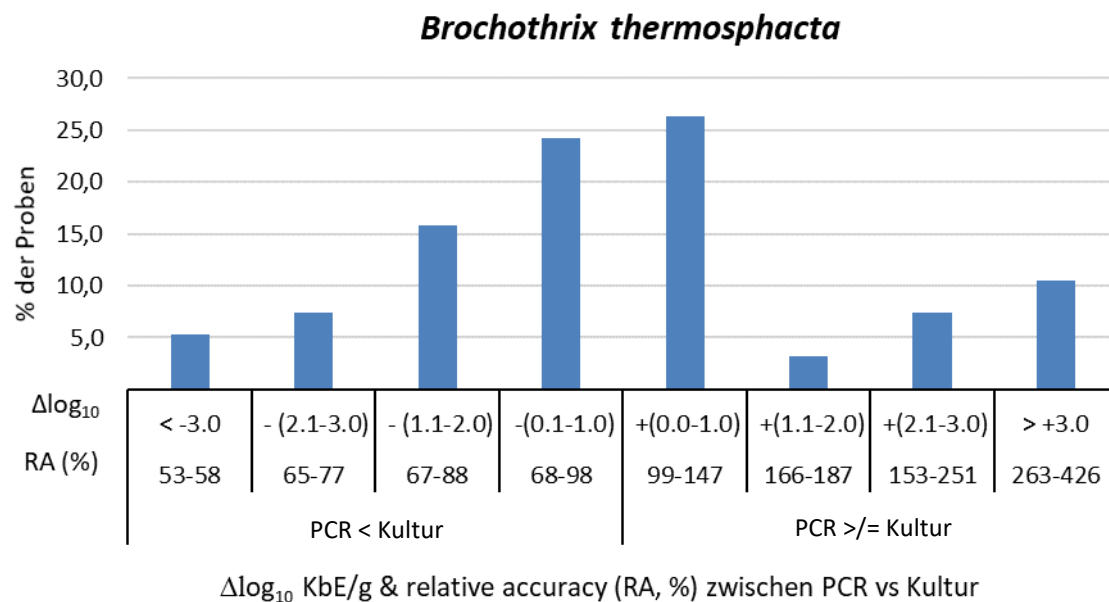
In der hier vorliegenden Studie wurde eine Behandlung mit Propidium Monoazid aus den oben genannten Gründen nicht vorgenommen; daher werden alle RA-Werte von über 100 % als akzeptabel bewertet. Zusammengefasst erreichten 77,9 % der Proben für *Pseudomonas* (RA > 89 %), 85,3 % für *Enterobacteriaceae* (RA > 87 %), 71,6 % für *B. thermosphacta* (RA > 68 %) und 66,3 % für *Staphylococcus* (RA > 76 %) akzeptable Werte für den Vergleich beider angewandten Methoden (Kultur vs. qPCR) mit  $\Delta \geq [-]1,0 \log_{10}$  KbE/g.



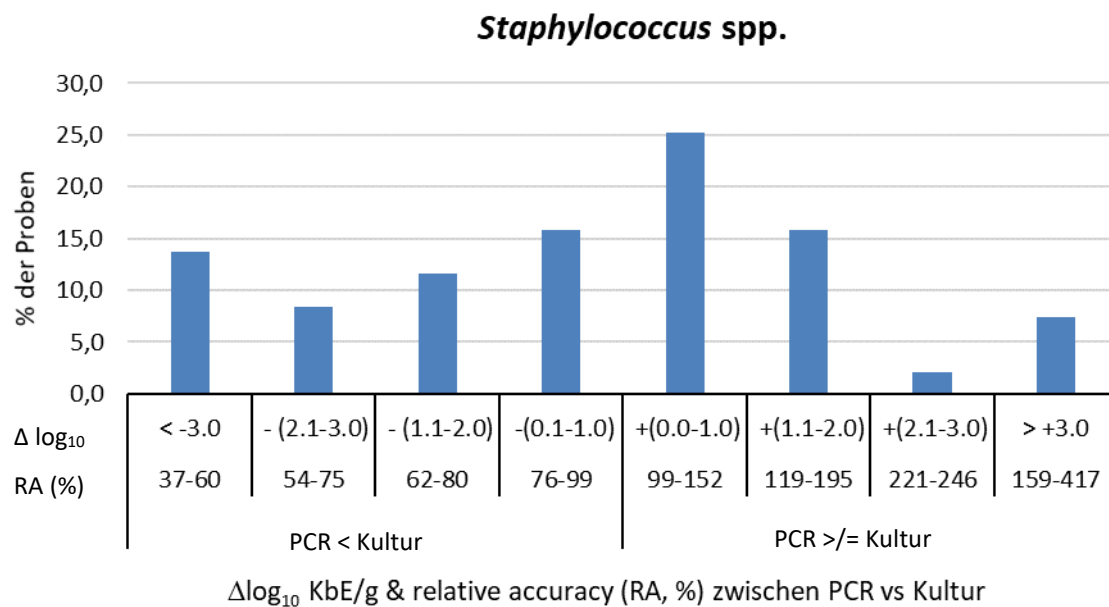
**Abbildung 1:** Verteilung der Proben mit detektierten *Pseudomonas* spp. entsprechend ihrer  $\Delta \log_{10}$  cfu/g und relative accuracy (RA, in Prozent) zwischen den Multiplex qPCRs und Kultur, gewonnen aus insgesamt 96 Proben frischen und natürlich verdorbenen Fleisches.



**Abbildung 2:** Verteilung der Proben mit detektierten *Enterobacteriaceae* entsprechend ihrer  $\Delta \log_{10}$  cfu/g und relative accuracy (RA, in Prozent) zwischen den Multiplex qPCRs und Kultur, gewonnen aus insgesamt 96 Proben frischen und natürlich verdorbenen Fleisches.



**Abbildung 3:** Verteilung der Proben mit detektierten *Brochothrix thermosphacta* entsprechend ihrer  $\Delta \log_{10}$  cfu/g und relative accuracy (RA, in Prozent) zwischen den Multiplex qPCRs und Kultur, gewonnen aus insgesamt 96 Proben frischen und natürlich verdorbenen Fleisches.



**Abbildung 4:** Verteilung der Proben mit detektierten *Staphylococcus* spp. entsprechend ihrer  $\Delta \log_{10}$  cfu/g und relative accuracy (RA, in Prozent) zwischen den Multiplex qPCRs und Kultur, gewonnen aus insgesamt 96 Proben frischen und natürlich verdorbenen Fleisches.

#### 5.4 Untersuchung der Brühwürste mit artifiziell verdorbenem Fleisch

Für die Herstellung von Brühwürsten vom Typ „Lyoner“ wurde das Ausgangsmaterial 'rohes Fleisch' teilweise durch verdorbenes Fleisch (natürlicher Verderb herbeigeführt durch aerobe Lagerung für 2 Tage bei 20 °C) in verschiedenen Anteilen ersetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das verdorbene Fleisch die geruchlichen Eigenschaften der fertig gebrühten Lyoner nicht beeinträchtigt, um einen fiktiven Lebensmittelbetrug so real wie möglich zu simulieren.

Zudem wurde das verdorbene Fleisch vor dessen Verwendung mit Wasser abgespült, um die oberflächliche Schleimbildung abzuwaschen. Dieser hätte die technologischen Eigenschaften des Fleisches für die Wurstherstellung negativ beeinflusst. Durch das Abwaschen des verdorbenen Fleisches für die Untersuchungen soll ein Lebensmittelbetrug so nahe wie möglich nachgestellt werden. Trotz des Abspülens mit Wasser wurde sowohl bei der kulturellen Untersuchung als auch bei Anwendung der Multiplex qPCRs eine so hohe Keimbelastung in den Würsten festgestellt, dass die Richtwerte der DGHM überschritten wurden.



Neben verdorbenem Fleisch gibt es noch andere Quellen für den Eintrag von Keimen bei der Herstellung von Würsten, was bei der Bewertung der Ergebnisse der angewandten qPCRs berücksichtigt werden muss.

Auch frisches Fleisch enthält eine gewisse Anzahl an Mikroorganismen auf seiner Oberfläche (Lambert et al., 1991). Zudem stellen Kräuter und Gewürze eine Quelle für mikrobiologische Kontamination dar (McKee, 1995), was auch in dieser Studie für das verwendete Lyonergewürz durch Anwendung der Multiplex qPCRs festgestellt wurde. Die Oberflächen der Räume, in denen Lebensmittel hergestellt werden, sowie die dafür verwendeten Geräte und die Hände der Metzger sind weitere Eintragsquellen von Keimen (Stellato et al., 2016).

Was zudem bei der Anwendung der qPCR an Würsten im Allgemeinen bedacht werden muss, ist die Verwendung von Starterkulturen. Diese werden hauptsächlich bei der Herstellung von Rohwürsten eingesetzt (Leroy et al., 2006) und gehören gewöhnlich zur Familie der Milchsäurebakterien. Doch auch Katalase-positive Kokken, wie *Staphylococcus* spp., werden mitunter verwendet (Lücke, 2000). Da Milchsäurebakterien mit den hier entwickelten qPCRs nicht detektiert werden, stellen sie kein Problem für die numerische Auswertung der Ergebnisse dar. Jedoch könnte ihre Anwesenheit die Ergebnisse der qPCRs indirekt durch den hemmenden Effekt eines hohen mikrobiellen Hintergrundes auf den PCR-Prozess beeinflussen (Pennacchia et al., 2009; Wolffs et al., 2004).

Als Starterkulturen verwendete *Staphylococcus* spp. erhöhen unmittelbar die  $\log_{10}$  KbE/g Äquivalent-Werte des qPCR-Moduls für die Quantifizierung von *Staphylococcus* und müssen bei der Auswertung mit bedacht werden, um hohe falsch positive Ergebnisse zu verhindern. Da die entwickelten Multiplex qPCRs jedoch in erster Linie für die Beprobung von Brühwürsten entwickelt wurden, für deren Herstellung in der Regel keine Starterkulturen verwendet werden, ist dieser Aspekt vernachlässigbar.

Die selbst hergestellten Lyoner mit verschiedenen Anteilen an verdorbenem Fleisch wurden sowohl im rohen als auch im gebrühten Zustand mittels der entwickelten qPCRs auf ihren Zielkeimgehalt untersucht. Die rohen Würste wurden zudem kulturell beprobt. Die Menge an Zielkeimen in Nitratpökelsalz und Kutterhilfen wurde mittels qPCR ermittelt. Diese stellte sich dabei als sehr gering dar (unterhalb der Nachweisgrenze) und hatte somit keinen Einfluss auf die Ergebnisse der beprobten Würste.

Auch das Lyonergewürz wurde mittels der Multiplex qPCRs untersucht. Die dabei

festgestellten hohen Mengen an *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* und *Brochothrix* (6,7; 6,9 und 5,8 log<sub>10</sub> KbE/g äquivalent) könnten die Gesamtmenge dieser Zielkeime in den Würsten beeinflusst haben, die ausschließlich aus frischem Fleisch hergestellt wurden. Das frische Fleisch wies Keimzahlen unterhalb der Nachweisgrenze ( $< 1,0 \log_{10}$ ) in der kulturellen Untersuchung auf, weshalb hier der Keimgehalt des Gewürzes mitberücksichtigt werden muss.

Die Ergebnisse der qPCRs und der Kultur von frischem Fleisch, verdorbenem Fleisch, rohen und gebrühten Würsten wurden mittels *t*-Test und relative accuracy (RA) verglichen. Dabei wurden bei zwei Proben frischen Fleisches mittels den Multiplex qPCRs hohe Zahlen der Zielkeime nachgewiesen, während die mittels Kultur ermittelten Werte niedriger waren (RA: 155,4 %  $\pm$  25,8). Dies könnte darin begründet sein, dass das frische Fleisch für zwei Tage eingefroren war, bevor es für die Wurstherstellung aufgetaut wurde. Durch das Einfrieren könnte ein Teil der Fleischmikrobiota abgestorben sein, was zu einer niedrigeren Anzahl an kulturell nachweisbaren Zielkeimen geführt haben könnte (Elliott und Straka, 1964; Ray und Speck, 1973).

Die anhand der Multiplex qPCRs und Kultur ermittelten Werte für verdorbenes Fleisch, rohe und gebrühte Lyonerwürsten mit 5 %, 12 % und 25 % verdorbenem Fleisch waren sich sehr ähnlich (RA 90 % - 110 %). Obwohl das verdorbene Fleisch eine hohe Anzahl an Zielkeimen besaß, wurde es aufgrund der moderaten sensorischen Abweichungen als leicht verdorben eingestuft und im Brät verdünnt. Daher sollten die PCR-Inhibitoren dieser Proben einen geringeren Einfluss auf die PCR-Amplifikation gehabt haben als bei den Proben des stark verdorbenen Fleisches der Verderbsversuche (siehe 4.3.).

Zudem wurde mittels *t*-Test kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Multiplex qPCRs und der Kultur bei den nicht gebrühten Würsten festgestellt sowie zwischen den qPCR Werten der rohen und gebrühten Würste. Somit kann von einer identischen Anwendbarkeit der Multiplex qPCRs und der Kultur bei deren Anwendung auf nicht gebrühte Brühwürste ausgegangen werden.

Die Menge an Zielkeimen stieg in Würsten mit höheren Anteilen an verdorbenem Fleisch stetig an (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* und *Brochothrix*) beziehungsweise tendierte zum Anstieg (*Staphylococcus*). Im Vergleich zu den rohen Würsten fiel die detektierte Anzahl an Zielkeimen in den gebrühten Würsten etwas geringer aus, jedoch war der Unterschied nicht

statistisch signifikant. Außerdem lagen die Werte der RA zwischen roher und gebrühter Wurst in einem optimalen Bereich zwischen 93 % und 111 % (Mittelwert  $97,2 \% \pm 6,8$ ).

Nach Dashti et al. (2009) wird die Zellwand von Mikroorganismen während der Erhitzung aufgebrochen, sodass die DNA einfacher zu extrahieren ist. Dennoch beeinflusst die Probenmatrix die Menge an DNA-Ausbeute bei der Extraktion.

Die Konsistenz der Würste verändert sich während des Brühvorgangs von weich und breiig zu fest und elastisch. Es war daher schwieriger, die gebrühten Würste für die DNA-Extraktion mit Verdünnungsflüssigkeit zu homogenisieren, weshalb eine zusätzliche Zerkleinerung im Mixer vor der Homogenisierung im Stomacher bei allen gebrühten Würsten angewandt wurde. Dennoch könnte hierdurch noch nicht vollständig das Homogenisierungsniveau der ungebrühten Würste erreicht worden sein. Die Schwierigkeit in der Homogenisierung könnte der Grund dafür sein, dass in den gebrühten Würsten eine leicht geringere Anzahl an Zielkeimen detektiert wurde.

## 5.5 Untersuchung der Brühwurstproben aus dem Handel

Vierzehn der dreißig Brühwurstproben von zufällig gewählten Supermärkten und Metzgern wurden als „verdächtig“ klassifiziert. Dies wurde anhand des mithilfe der qPCRs ermittelten Kontaminationsniveaus von *Pseudomonas* und/oder *Enterobacteriaceae* festgelegt, welches über oder nahe an den Richt- und Warnwerten der DGHM lag.

Die Anzahl von *B. thermosphacta* war sehr variabel innerhalb der Brühwürste, jedoch wiesen nur zwei der vierzehn verdächtigen Proben Werte über dem in dieser Studie definierten Richtwert auf. Der Kontaminationslevel von *Staphylococcus* war ebenso variabel wie die von *Pseudomonas* und *Enterobacteriaceae*, hatte aber keinerlei Bezug zu den beiden Verderbserregern. Daher wären weitere Untersuchungen zu der Frage interessant, ob die nachgewiesenen *Staphylococcus* aus der Umgebung des Schlachthofes stammten oder durch nachträglichen Eintrag eine Kontamination stattfand.

Außerdem wären für die als verdächtig klassifizierten Brühwürste weitere Analysen nötig, um zu ermitteln, welchen Ursprung die nachgewiesenen Zielkeime hatten. Die Quellen dafür könnten sowohl das für die Wurstherstellung verwendete Fleisch als auch andere Zutaten, die Gerätschaften oder Hände der Metzger sein (Björkroth und Korkeala, 1997; Metaxopoulos et

al., 2003; Normanno et al, 2007). Falls die Kontamination vor dem Brühvorgang stattgefunden hat, müsste eine kulturelle Untersuchung deutlich weniger Keimgehalte ergeben als die Multiplex qPCRs. Im Gegensatz dazu würde bei einer Rekontamination der Würste mit den Zielkeimen nach dem Erhitzen eine kulturelle Untersuchung Werte nahe derer der Multiplex qPCR aufweisen.

## 5.6 Konsequenzen für den Verbraucherschutz

Lebensmittelbetrug oder „Food Fraud“ wird definiert als die vorsätzliche Täuschung von Verbrauchern durch das Inverkehrbringen von Lebensmitteln, um damit finanzielle oder wirtschaftliche Vorteile für den Lebensmittelunternehmer zu erlangen (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2020). Dabei kann es sich um bewusste Falschdeklaration des Lebensmittels handeln oder um die Verwendung unerlaubter Zusätze (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2020). In Europa gibt es bislang keine einheitliche rechtliche Definition des Begriffs „Food Fraud“ oder „Lebensmittelbetrug“, weshalb jeder Mitgliedsstaat eigene Ansichten vertritt.

Die Gesetzgebung verbietet die Verwendung verdorbener Lebensmittel für die Herstellung jeglicher Nahrungsmittel (VO (EG) Nr. 178/2002 und LMHV, 2016). Die Verwendung verbotener Inhaltsstoffe machte im Jahr 2014 in Europa 10 % der Lebensmittelbetrugsfälle aus (Europäische Kommission, 2014), worunter auch die Verarbeitung verdorbenen Fleisches als Zutat in Brühwurstprodukten fallen würde.

Unter den Begriff „Verbraucherschutz“ fällt neben dem Schutz des Verbrauchers vor wirtschaftlicher Benachteiligung auch die umfassende Information des Verbrauchers als Grundlage für dessen Kaufentscheidung, sowie dessen Sicherheit (Polzin et al., 2016).

Bei der Verwendung von verdorbenem Fleisch für die Herstellung von Brühwürsten und deren Inverkehrbringen würde neben dem Aspekt der Rechtswidrigkeit sowohl die umfassende Information des Verbrauchers umgangen, als auch unter Umständen dessen Gesundheit gefährdet werden. Vermehrungsfähige Mikroorganismen werden in Abhängigkeit der Intensität des Erhitzungsprozesses während der Wurstherstellung reduziert oder irreversibel inaktiviert (Koch und Fuchs, 2016) und dabei das Infektionsrisiko für den Verbraucher gesenkt. Dennoch kann der Verzehr von erhitzten Wurstwaren mit mikrobiell hochkontaminierten Ausgangsprodukten die Gesundheit des Konsumentens beeinträchtigen, z.B. durch hitzestabile Toxine von *S. aureus* (BfR, 2005).

Auch die Ekel erregende Komponente für den Verbraucher, auf die in § 2 der Lebensmittelhygieneverordnung hingewiesen wird, darf nicht außer Acht gelassen werden (LMHV, 2016).

Die Kontrolle der Einhaltung oben genannter Vorschriften in Bezug auf die verwendeten Ausgangsprodukte von Brühwürsten gestaltete sich bisher schwierig, da es mit kulturellen Anzuchtverfahren nicht möglich ist, die mikrobiologische Qualität der Ausgangsprodukte erhitzter Wurstwaren zu rekonstruieren. Kultur-unabhängige Verfahren, wie beispielsweise der Nachweis von Endotoxinen oder flüchtiger organischer Verbindungen, besitzen für die Beurteilung der Frische der Rohwaren keine bis nur begrenzte Aussagekraft. Daher war es Ziel dieser Studie, eine PCR-basierte Methode zu entwickeln.

Durch die entwickelten Multiplex qPCRs ist es möglich, eine Aussage über den mikrobiologischen Zustand der verwendeten Rohware (in diesem Falle Fleisch) bezüglich der vier Zielkeime auch im erhitzten Endprodukt zu treffen. Sie stellen somit ein neues Werkzeug für die Überprüfung der Einhaltung der Lebensmittelhygiene dar und können direkt zum Verbraucherschutz beitragen.

Einige Verbraucher sind durch die „Gammelfleischskandale“ (Badenschier et al., 2013; Handelsblatt, 2013) der letzten Jahre verunsichert und legen folglich zunehmend Wert auf Transparenz und Produktqualität. Mit den etablierten Multiplex qPCRs dieser Studie wird es dem Lebensmittelunternehmer ermöglicht, sich überprüfbar von der illegalen Verwendung verdorbener Ausgangsprodukte zu distanzieren.

Lebensmittelunternehmen könnten sich mit Hilfe solcher Testsysteme vor Imageverlusten und wirtschaftlichen Schäden durch falschen Verdacht schützen. Auch das Risiko, dass einzelne Hersteller, die die Verwendung verdorbener Rohstoffe bisher unentdeckt betrieben haben, weiterhin solche Methoden anwenden, wird gesenkt.

Zuletzt kann das Vertrauen und der Schutz des Verbrauchers innerhalb des Fleisch- und Wurstsektors durch zukünftige routinemäßige Anwendung solcher Testsysteme deutlich erhöht und gestärkt werden. Durch Erkennen und Vorbeugen betrügerischer Handlungen wird zudem der Konsument effektiv vor Täuschung geschützt.

## 6 Zusammenfassung

Kulturelle Methoden sind der Goldstandard, um die Kontamination von Lebensmitteln mit Mikroorganismen zu ermitteln. Jedoch ist es damit nicht möglich, den bakteriellen Status der verwendeten Rohwaren von erhitzten Fleischprodukten zu evaluieren. Aus diesem Grund wurden zwei Multiplex qPCRs entwickelt, die vier häufig auf Fleisch vorkommende Bakteriengruppen (*Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* und *Staphylococcus* spp.) detektieren und quantifizieren. Für die Auswahl der vier Bakteriengruppen wurden umfangreiche kulturelle Voruntersuchungen durchgeführt.

Sowohl die Spezifität als auch die Sensitivität der qPCRs, die beide anhand von 68 verschiedenen Bakterienreferenzstämmen validiert wurden, lag bei 99 % bis 100 %. Insgesamt wurden 96 Schweinefleischproben in verschiedenen Stadien der Frische und des Verderbs (an Tag 1, 2, 3 und 6 bei 22 °C sowie an Tag 6, 13 und 20 bei 4 °C), sowie 12 selbstgemachte Lyoner mit verschiedenen Anteilen an verdorbenem Fleisch (0 %, 5 %, 12 % und 25 %) verwendet, um die Anwendbarkeit der entwickelten Multiplex qPCRs zu validieren.

Dafür wurden die Ergebnisse der qPCRs mit denen der konventionellen kulturellen Methoden anhand des Unterschiedes  $\Delta \log_{10}$  KbE/g, der relative accuracy und des *t*-Tests ( $p > 0,05$ ) verglichen. Die Ergebnisse der beiden Methoden Kultur und qPCR erwiesen sich dabei in den nicht erhitzten Proben als ähnlich. Auch die Menge an per Multiplex qPCR detektierter DNA in den selbst hergestellten Lyonern war nach einer Optimierung des Extraktionsprotokolls vor und nach deren Erhitzung ähnlich, sodass die veränderte Konsistenz der Würste nach dem Brühen die Methode nicht beeinträchtigt. Nach der Entwicklung und Validierung der Multiplex qPCRs wurden diese auf 30 verschiedene Brühwürste von zufällig ausgewählten Supermärkten und Metzgern angewendet. Dabei zeigte sich, dass hinsichtlich der Keimzahlen teilweise auffällige Brühwürste im Handel erhältlich sind. Dies ließ wiederum den Verdacht entstehen, dass einige Brühwürste ( $n = 14$ ) mit Fleisch hergestellt wurden, das eine Keimbelastung, insbesondere mit *Pseudomonas* ( $> 6,0 \log_{10}$  KbE/g) und *Enterobacteriaceae* ( $> 5,0 \log_{10}$  KbE/g) über den Richt- und Warnwerten der DGHM aufwies.

Mithilfe der entwickelten Multiplex qPCRs können vier auf Fleisch relevante Bakteriengruppen in erhitzten Wurstwaren detektiert werden und dabei Informationen über den hygienischen Status der verwendeten Rohwaren liefern. Damit erweisen sich die qPCRs als Instrument zur Verifizierung der mikrobiologischen Qualität und können folglich zur Lebensmittelsicherheit und zum Schutz der Verbraucher beitragen.



## 7 Summary

Cultural methods are the gold standard to determine the contamination of food with microorganisms. However, with these methods it is not possible to evaluate the bacterial status of the raw products of heat-treated meat products. For this reason, two multiplex qPCRs were developed which detect and quantify four bacterial groups frequently occurring on meat (*Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* and *Staphylococcus* spp.). For the selection of four bacterial groups, extensive cultural preliminary investigations were carried out.

The specificity as well as the sensitivity of the qPCRs, validated by using 68 different microbial reference strains, was 99% to 100 %. All in all, 96 pork samples of different stages of freshness and spoilage (on day 1, 2, 3 and 6 at 22 °C and on day 6, 13 and 20 at 4 °C) as well as 12 self-made Lyoner with variable ratio of spoiled meat (0 %, 5 %, 12 % and 25 %).were used to validate the applicability of the developed multiplex qPCRs. For that, the results of the qPCRs were compared with the results of the conventional cultural methods by using difference  $\Delta\log_{10}$  cfu/g, relative accuracy and *t*-test ( $p > 0,05$ ). The results of both methods, culture and qPCR, turned out to be similar in the not heat-treated samples. Also, the amount of DNA in self-produced Lyoner detected by multiplex qPCR was similar after an optimization of the extraction protocol before and after heating, so that the changed consistency of the sausages after cooking doesn't restrict the method. After the development and validation of the multiplex qPCRs, they were applied to 30 different „Bologna-type“ sausages from randomly chosen supermarkets and butchers. They showed that suspicious Bologna-type sausages concerning the amounts of bacteria are available in retail. This aroused suspicion that some Bologna-type sausages ( $n = 14$ ) were produced with meat which contained a bacterial load especially of *Pseudomonas* ( $> 6,0 \log_{10}$  cfu/g) and *Enterobacteriaceae* ( $> 5,0 \log_{10}$  cfu/g) above the guidance and critical values of DGHM.

With the help of the developed Multiplex qPCRs, four bacterial groups relevant for meat can be detected in heat-treated meat products, which gives information about the hygienic status of the raw material used. It is evident that the qPCRs are an instrument of verifying the microbiological quality and thus can contribute to food safety and protection of consumers.





## 8 Literaturverzeichnis

ABDOUCHAKOUR, F., AUJOLAT, F., LICZNAR-FAJARDO, P., MARCHANDIN, H., TOUBIANA, M., PARER, S., LOTTHÉ, A. & JUMAS-BILAK, E. (2018) Intracloonal variations of resistance and phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clone ST308: A key to success within a hospital? *International Journal of Medical Microbiology* 308, 279-289

ABOLGHAIT, S. K., FATHI, A. G., YOUSSEF, F. M. & ALGAMMAL, A. M. (2020) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from chicken meat and giblets often produces staphylococcal enterotoxin B (SEB) in non-refrigerated raw chicken livers. *International Journal of Food Microbiology* 328, 108669

ACKERS, M.-L., MAHON, B. E., LEAHY, E., GOODE, B., DAMROW, T., HAYES, P. S., BIBB, W. F., RICE, D. H., BARRETT, T. J., HUTWAGNER, L., GRIFFIN, P. M. & SLUTSKER, L. (1998) An Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Leaf Lettuce Consumption. *The Journal of Infectious Diseases* 177, 1588-1593

ADAM, K.H., FLINT, S.H. & BRIGHTWELL, G. (2010). Psychrophilic and psychrotrophic clostridia: sporulation and germination processes and their role in the spoilage of chilled, vacuum-packaged beef, lamb and venison. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45, 1539–1544.

AHN, C. & STILES, M. E. (1990) Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 302-310

AL-TARAZI, Y. H., ALBETAR, M. A. & ALABOUDI, A. R. (2009) Biotyping and enterotoxigenicity of *Staphylococci* isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. *Food Research International* 42, 374-379

ARCHER, G. L. (1998) *Staphylococcus aureus*: A Well-Armed Pathogen. *Clinical Infectious Diseases* 26, 1179-1181

AYRES, J. C. (1960) The relationship of organisms of the genus *Pseudomonas* to the spoilage of meat, poultry and eggs. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 471-486

BACON, R. T., BELK, K. E., SOFOS, J. N., CLAYTON, R. P., REAGAN, J. O. & SMITH, G. C. (2000) Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination. *J Food Prot* 63, 1080-1086

BADENSCHIER, F., BARTZ, D., BENNING, R., BIRKEL, K., BÖRNECKE, S., CHEMNITZ, C., FATHEUER, T., GURA, S., KRIENER, M., MARI, F. & MCFARLAND, K. (2013) Fleischatlas. Daten und Fakten über Tiere als Nahrungsmittel. [https://www.boell.de/sites/default/files/fleischatlas\\_1\\_1.pdf?dimension1=division\\_oen](https://www.boell.de/sites/default/files/fleischatlas_1_1.pdf?dimension1=division_oen).  
Letzter Zugriff 09.07.2020

BALABAN, N. & RASOOLY, A. (2000) Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 61, 1-10

BATT, C. A. (2016) Microbial Food Spoilage. In *Reference Module in Food Science*, Elsevier

BECKER, K., HEILMANN, C. & PETERS, G. (2014) Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 27, 870

BERNIER-LACHANCE, J., ARSENAULT, J., USONGO, V., PARENT, É., LABRIE, J., JACQUES, M., MALOUIN, F. & ARCHAMBAULT, M. (2020) Prevalence and characteristics of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) isolated from chicken meat in the province of Quebec, Canada. *Plos One* 15, e0227183

BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung (2005) Kritischer als Gammelfleisch: Toxinbildende Bakterien und ihre Giftstoffe in Fleisch und Fleischerzeugnissen, Stellungnahme Nr. 004/2006 des BfR vom 21. Dezember 2005. [https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/kritischer\\_als\\_gammelfleisch\\_toxinbildende\\_bakterien\\_und\\_ihre\\_giftstoffe\\_in\\_fleisch\\_und\\_fleischerzeugnissen.pdf](https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/kritischer_als_gammelfleisch_toxinbildende_bakterien_und_ihre_giftstoffe_in_fleisch_und_fleischerzeugnissen.pdf). Letzter Zugriff 19.6.2020

BHADURI, S. (2003) A comparison of sample preparation methods for PCR detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* from ground pork using swabbing and slurry homogenate techniques. *Mol Cell Probes* 17, 99-105

BJÖRKROTH, K. J. & KORKEALA, H. J. (1997) Use of rRNA gene restriction patterns to evaluate lactic acid bacterium contamination of vacuum-packaged sliced cooked whole-meat product in a meat processing plant. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 448

BLAGOJEVIC, B. & ANTIC, D. (2014) Assessment of potential contribution of official meat inspection and abattoir process hygiene to biological safety assurance of final beef and pork carcasses. *Food Control* 36, 174-182

BLICKSTAD, E. (1983) Growth and end product formation of two psychrotrophic *Lactobacillus* spp. and *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509T at different pH values and temperatures. *Appl Environ Microbiol* 46, 1345-1350

BLICKSTAD, E., ENFORS, S. O. & MOLIN, G. (1981) Effect of Hyperbaric Carbon Dioxide Pressure on the Microbial Flora of Pork Stored at 4 or 14°C. *Journal of Applied Bacteriology* 50, 493-504

BLICKSTAD, E. & MOLIN, G. (1983a) Carbon Dioxide as a Controller of the Spoilage Flora of Pork, with Special Reference to Temperature and Sodium Chloride. *J Food Prot* 46, 756-763

BLICKSTAD, E. & MOLIN, G. (1983b) The microbial flora of smoked pork loin and frankfurter sausage stored in different gas atmospheres at 4°C. *Journal of Applied Bacteriology* 54, 45-56

BLIXT, Y. & BORCH, E. (2002) Comparison of shelf life of vacuum-packed pork and beef. *Meat Sci* 60, 371-378

BONA, E., CANTAMESSA, S., MASSA, N., MANASSERO, P., MARSANO, F., COPETTA, A., LINGUA, G., D'AGOSTINO, G., GAMALERO, E. & BERTA, G. (2017) Arbuscular

mycorrhizal fungi and plant growth-promoting *Pseudomonads* improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study. *Mycorrhiza* 27, 1-11

BONKE, R., DREES, N. & GAREIS, M. (2016) Detection of psychrophilic and psychrotolerant *Clostridium* spp. in chilled fresh vacuum-packed meat using different PCR methods. *FEMS Microbiol Lett* 363

BORCH, E., KANT-MUERMANS, M.-L. & BLIXT, Y. (1996) Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 103-120

BORCH, E. & MOLIN, G. (1988) Numerical taxonomy of psychrotrophic lactic acid bacteria from prepacked meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek* 54, 301-323

BOSTRÖM, K. H., SIMU, K., HAGSTRÖM, Å. & RIEMANN, L. (2004) Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. *Limnology and Oceanography: Methods* 2, 365-373

BRIGHTWELL, G., BOEREMA, J., MILLS, J., MOWAT, E. & PULFORD, D. (2006) Identifying the bacterial community on the surface of Intralox belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. *Int J Food Microbiol* 109, 47-53

BRIGHTWELL, G., CLEMENS, R., URLICH, S. & BOEREMA, J. (2007) Possible involvement of psychrotolerant *Enterobacteriaceae* in blown pack spoilage of vacuum-packaged raw meats. *Int J Food Microbiol* 119, 334-339

BRIGHTWELL, G. & CLEMENS, R. (2012) Development and validation of a real-time PCR assay specific for *Clostridium estertheticum* and *C. estertheticum*-like psychrotolerant bacteria. *Meat Sci* 92, 697-703

BRODA, D.M., LAWSON, P.A., BELL, R.G. & MUSGRAVE, D.R., (1999). *Clostridium frigidicarnis* sp.nov., a psychrotolerant bacterium associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1539–1550.

BRODA D.M., DeLACY K.M., BELL R.G., BRAGGINS T.J. & Cook R.L. (1996) Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gasimpermeable plastic casings. *Int. J. Food Microbiol.* 29,335–352

BRODA, D.M., SAUL, D.J., LAWSON, P.A., BELL, R.G. & MUSGRAVE, D.R. (2000a). *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat *International.Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 107–118.

BRODA, D.M., SAUL, D.J., BELL, R.G. & MUSGRAVE, D.R. (2000b). *Clostridium algidixylanolyticum* sp. nov., a psychrotolerant, xylan degrading, spore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 623–631

BRODA D.M., BOEREMA J.A. & BRIGHTWELL G (2009). Sources of psychrophilic and psychrotolerant clostridia causing spoilage of vacuum-packed chilled meats, as determined by PCR amplification procedure. *J Appl Microbiol.* 107,178-186.

BRUCKNER, S., ALBRECHT, A., PETERSEN, B. & KREYENSCHMIDT, J. (2012a) Characterization and Comparison of Spoilage Processes in Fresh Pork and Poultry. *Journal of Food Quality* 35, 372-382

BRUCKNER, S., ALBRECHT, A., PETERSEN, B. & KREYENSCHMIDT, J. (2012b) Influence of cold chain interruptions on the shelf life of fresh pork and poultry. *International Journal of Food Science & Technology* 47, 1639-1646

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2020) Was ist Lebensmittelbetrug?

[https://www.bvl.bund.de/DE/Arbeitsbereiche/01\\_Lebensmittel/03\\_Verbraucher/16\\_Food\\_Fraud/02\\_Was%20ist%20Lebensmittelbetrug/Was%20ist%20Lebensmittelbetrug\\_node.html](https://www.bvl.bund.de/DE/Arbeitsbereiche/01_Lebensmittel/03_Verbraucher/16_Food_Fraud/02_Was%20ist%20Lebensmittelbetrug/Was%20ist%20Lebensmittelbetrug_node.html)

Letzter Zugriff: 11.08.2020

BYRD, A. L., BELKAID, Y. & SEGRE, J. A. (2018) The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology* 16, 143

CALLEJÓN, R. M., RODRÍGUEZ-NARANJO, M. I., UBEDA, C., HORNEDO-ORTEGA, R., GARCIA-PARRILLA, M. C. & TRONCOSO, A. M. (2015) Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes. *Foodborne Pathogens and Disease* 12, 32-38

CARRIZOSA, E., BENITO, M. J., RUIZ-MOYANO, S., HERNÁNDEZ, A., VILLALOBOS, M. D. C., MARTÍN, A. & CÓRDOBA, M. D. G. (2017) Bacterial communities of fresh goat meat packaged in modified atmosphere. *Food Microbiol* 65, 57-63

CASABURI, A., DE FILIPPIS, F., VILLANI, F. & ERCOLINI, D. (2014) Activities of strains of *Brochothrix thermosphacta* in vitro and in meat. *Food Research International* 62, 366-374

CASABURI, A., PIOMBINO, P., NYCHAS, G.-J., VILLANI, F. & ERCOLINI, D. (2015) Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiol* 45, 83-102

CAVILL, L., RENTERIA-MONTEERRUBIO, A.L., HELPS, C.R. & CORRY, J.E.L. (2011). Detection of coldtolerant clostridia other than *Clostridium estertheticum* in raw vacuum-packed chillstored meat. *Food Microbiol.* 28, 957–963.

CERCA, N., PIER, G. B., VILANOVA, M., OLIVEIRA, R. & AZEREDO, J. (2005) Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Research in Microbiology* 156, 506-514

CEZARD, C., FARVACQUES, N. & SONNET, P. (2015) Chemistry and Biology of Pyoverdines, *Pseudomonas* Primary Siderophores. *Current Medicinal Chemistry* 22, 165-186

CHAILLOU, S., CHAULOT-TALMON, A., CAEKEBEKE, H., CARDINAL, M., CHRISTIEANS, S., DENIS, C., HÉLÈNE DESMONTS, M., DOUSSET, X., FEURER, C., HAMON, E., JOFFRAUD, J.-J., LA CARBONA, S., LEROI, F., LEROY, S., LORRE, S., MACÉ, S., PILET, M.-F., PRÉVOST, H., RIVOLLIÉ, M., ROUX, D., TALON, R., ZAGOREC, M. & CHAMPOMIER-VERGÈS, M.-C. (2015) Origin and ecological selection

of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. The ISME Journal 9, 1105-1118

CHAVES, R. D., SILVA, A. R., SANT'ANA, A. S., CAMPANA, F. B. & MASSAGUER, P. R. (2012) Gas-producing and spoilage potential of *Enterobacteriaceae* and lactic acid bacteria isolated from chilled vacuum-packaged beef. International Journal of Food Science & Technology 47, 1750-1756

COLLINS, M., WALLBANKS, S., LANE, D., SHAH, J., NIETUPSKI, R., SMIDA, J., DORSCH, M. & STACKEBRANDT, E. (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 41, 240-246

CRAMTON, S. E., GERKE, C., SCHNELL, N. F., NICHOLS, W. W. & GÖTZ, F. (1999) The Intercellular Adhesion Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. Infection and Immunity 67, 5427

CREMONESI, P., CASTIGLIONI, B., Malferrari, G., BIUNNO, I., VIMERCATI, C., MORONI, P., MORANDI, S. & LUZZANA, M. (2006) Technical Note: Improved Method for Rapid DNA Extraction of Mastitis Pathogens Directly from Milk. J Dairy Sci 89, 163-169

CROSA, J. H. (1997) Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61, 319

CUCARELLA, C., SOLANO, C., VALLE, J., AMORENA, B., LASA, Í. & PENADÉS, J. R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. Journal of Bacteriology 183, 2888

DAINTY, R. H., EDWARDS, R. A. & HIBBARD, C. M. (1985) Time course of volatile compound formation during refrigerated storage of naturally contaminated beef in air. Journal of Applied Bacteriology 59, 303-309



DAINTY, R. H., EDWARDS, R. A., HIBBARD, C. M. & MARNEWICK, J. J. (1989) Volatile compounds associated with microbial growth on normal and high pH beef stored at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 281-289

DAINTY, R. H. & MACKEY, B. M. (1992) The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology* 73, 103s-114s

DAINTY, R. H., SHAW, B. G. & ROBERTS, T. A. (1983) Microbial and chemical changes in chill-stored red meats. *Society for Applied Bacteriology symposium series* 11, 151-178

DALGAARD, P. (1995) Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *International Journal of Food Microbiology* 26, 305-317

DASHTI, A. A., JADAON, M. M., ABDULSAMAD, A. M. & DASHTI, H. (2009) Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Medical Journal* 41 41 (2), 117-122

DAVIDSON, C. M. & ARTREE, E. F. (1968) Cytochrome as a Guide to Classifying Bacteria: Taxonomy of *Microbacterium thermosphactum*. *Nature* 220, 502-504

DE BENTZMANN, S. & PLÉSIAT, P. (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environmental Microbiology* 13, 1655-1665

DE CESARE, A., PASQUALI, F., LUCCHI, A. & MANFREDA, G. (2014) Relative Accuracy, Specificity and Sensitivity of a 5' Nuclease Real-Time PCR Assay for *Listeria monocytogenes* Detection in Naturally Contaminated Pork Cuts. *Food Analytical Methods* 7, 1359-1365

DE FILIPPIS, F., LA STORIA, A., VILLANI, F. & ERCOLINI, D. (2013) Exploring the Sources of Bacterial Spoilers in Beefsteaks by Culture-Independent High-Throughput Sequencing. *Plos One* 8

DE JONGHE, V., COOREVITS, A., VAN HOORDE, K., MESSENS, W., VAN LANDSCHOOT, A., DE VOS, P. & HEYNDRICKX, M. (2011) Influence of Storage Conditions on the Growth of *Pseudomonas* Species in Refrigerated Raw Milk. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 460

DEURENBERG, R. H., VINK, C., KALENIC, S., FRIEDRICH, A. W., BRUGGEMAN, C. A. & STOBBERINGH, E. E. (2007) The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* 13, 222-235

DGHM (2014a) Richt- und Warnwerte für rohes, gewürztes oder mariniertes Schweinefleisch. Beuth Verlag

DGHM (2014b) Richt- und Warnwerte für ungewürztes und gewürztes Hackfleisch aus Schweine- und/oder Rindfleisch auf Handelsebene. Beuth Verlag

DGHM (2018a) Eine Empfehlung der ständigen Arbeitsgemeinschaft mikrobiologische Richt- und Warnwerte für Lebensmittel. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM E.V.). Präambel (Vom 20. März 2018). <https://www.dghm.org/entwuerfe/>. Letzter

DGHM (2018b) Richt- und Warnwerte für Brühwurst, Kochwurst, Kochpökelware sowie Sülzen und Aspikwaren (ST = Stückware, ganze Stücke ohne Anschnitt; A = Aufschnittware, Scheiben und Stücke mit Anschnitt und Brühwürstchen im Sinne des Leitsatzes 2.221) auf Handelsebene. Beuth Verlag

DOMINGUEZ, S. A. & SCHAFFNER, D. W. (2007) Development and validation of a mathematical model to describe the growth of *Pseudomonas* spp. in raw poultry stored under aerobic conditions. *International Journal of Food Microbiology* 120, 287-295

DORN-IN, S., SCHWAIGER, K., SPRINGER, C., BARTA, L., ULRICH, S. & GAREIS, M. (2018) Development of a multiplex qPCR for the species identification of *Clostridium estertheticum*, *C. frigidophilum*, *C. bowmanii* and *C. tagluense*-like from blown pack spoilage (BPS) meats and from wild boars. *Int J Food Microbiol* 286, 162-169

DOULGERAKI, A. I., ERCOLINI, D., VILLANI, F. & NYCHAS, G.-J. E. (2012) Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology* 157, 130-141

DOULGERAKI, A. I. & NYCHAS, G.-J. E. (2013) Monitoring the succession of the biota grown on a selective medium for pseudomonads during storage of minced beef with molecular-based methods. *Food Microbiol* 34, 62-69

DOULGERAKI, A. I., PARAMITHIOTIS, S. & NYCHAS, G.-J. E. (2011) Characterization of the *Enterobacteriaceae* community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology* 145, 77-83

DROSINOS, E. H. & BOARD, R. G. (1994) Metabolic activities of pseudomonads in batch cultures in extract of minced lamb. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 613-620

DROSINOS, E. H. & BOARD, R. G. (1995) Attributes of microbial associations of meat growing as xenic batch cultures in a meat juice at 4 °C. *International Journal of Food Microbiology* 26, 279-293

DSMZ (2021) <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-3456>. Letzter Zugriff: 21.01.2021

DSMZ (2021) <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-4543>. Letzter Zugriff: 21.01.2021

DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) 2019/627 vom 15.03.2019 (ABl. L 131 vom 17.05.2019, S. 51), ber. ABl. L 325 vom 16.12.2019, S. 183.

EBERL, L. (1999) N-Acyl Homoserinelactone-mediated Gene Regulation in Gram-negative Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 493-506

EDDY, B. P. (1960) The use and meaning of the term 'psychrophilic'. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 189-190

EFSA (2009) Joint scientific report of ECDC, EFSA and EMEA on meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in livestock, companion animals and food. *EFSA Journal* 7, 301r

EFSA (2016) Growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat. *EFSA Journal* 14, e04523

EGAN, A. F. (1983) Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek* 49, 327-336

ELLIOTT, R. P. & STRAKA, R. P. (1964) Rate of Microbial Deterioration of Chicken Meat at 2°C. After Freezing and Thawing<sup>1</sup>. *Poultry Science* 43, 81-86

ERCOLINI, D., CASABURI, A., NASI, A., FERROCINO, I., DI MONACO, R., FERRANTI, P., MAURIELLO, G. & VILLANI, F. (2010a) Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. *International Journal of Food Microbiology* 142, 120-131

ERCOLINI, D., FERROCINO, I., LA STORIA, A., MAURIELLO, G., GIGLI, S., MASI, P. & VILLANI, F. (2010b) Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiol* 27, 137-143

ERCOLINI, D., FERROCINO, I., NASI, A., NDAGIJIMANA, M., VERNOCCHI, P., LA STORIA, A., LAGHI, L., MAURIELLO, G., GUERZONI, M. E. & VILLANI, F. (2011) Monitoring of Microbial Metabolites and Bacterial Diversity in Beef Stored under Different Packaging Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 7372-7381

ERCOLINI, D., RUSSO, F., BLAIOTTA, G., PEPE, O., MAURIELLO, G. & VILLANI, F. (2007) Simultaneous Detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis* and *P. putida* from Meat

by Use of a Multiplex PCR Assay Targeting the *carA* Gene. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2354

ERCOLINI, D., RUSSO, F., NASI, A., FERRANTI, P. & VILLANI, F. (2009) Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their Spoilage Potential In Vitro and in Beef. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1990

ERCOLINI, D., RUSSO, F., TORRIERI, E., MASI, P. & VILLANI, F. (2006) Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4663-4671

ERICHSEN, I. & MOLIN, G. (1981) Microbial Flora of Normal and High pH Beef Stored at 4 °C in Different Gas Environments. *J Food Prot* 44, 866-869

ESPOSITO, S. & DE SIMONE, G. (2017) Update on the main MDR pathogens: prevalence and treatment options. *Infez Med* 25, 301-310

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2014) Food Fraud Network Activity Report 2014. The Food Fraud Network – Background and types of cases exchanged.

[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/official-controls\\_food-fraud\\_network-activity-report\\_2014.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/official-controls_food-fraud_network-activity-report_2014.pdf). Letzter Zugriff 09.07.2020

EWING, W. H., FARMER III, J. J. & BRENNER, D. J. (1980) Proposal of *Enterobacteriaceae* fam. nov., nom. rev. to Replace *Enterobacteriaceae* Rahn 1937, nom. fam. cons. (Opin. 15, *Jud. Comm.* 1958), Which Lost Standing in Nomenclature on 1 January 1980. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 30, 674-675

FARBER, J. M. (1991) Microbiological Aspects of Modified-Atmosphere Packaging Technology - A Review1. *J Food Prot* 54, 58-70

FAUCITANO, L., IELO, M. C., STER, C., LO FIEGO, D. P., METHOT, S. & SAUCIER, L. (2010) Shelf life of pork from five different quality classes. *Meat Sci* 84, 466-469

- FOX, P. F., P. POWER & COGAN, T. M. (1989) Isolation and molecular characteristics. In *Enzymes of psychrotrophs in raw foods*. Hrsg. MCKELLAR, R. C. Boca Raton, Florida, CRC Press. 57-120
- FREDRICKSON, A. G. (1977) Behavior of mixed cultures of microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 31, 63-87
- FUQUA, W. C., WINANS, S. C. & GREENBERG, E. P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR–LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269-275
- GARDNER, G. A. & STEWART, D. J. (1966a) The Bacterial Production of Glutamic Acid in Stored Comminuted Beef. *Journal of Applied Bacteriology* 29, 365-374
- GARDNER, G. A. & STEWART, D. J. (1966b) Changes in the free amino and other nitrogen compounds in stored beef muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 17, 491-496
- GATERMANN, S. & MIKSITS, K. (2009) Staphylokokken. In *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Hrsg. HAHN, H., KAUFMANN, S. H. E., SCHULZ, T. F., SUERBAUM, S. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg. 191-202
- GHAFIR, Y., CHINA, B., DIERICK, K., DE ZUTTER, L. & DAUBE, G. (2008) Hygiene Indicator Microorganisms for Selected Pathogens on Beef, Pork, and Poultry Meats in Belgium. *J Food Prot* 71, 35-45
- GIANNUZZI, L., PINOTTI, A. & ZARITZKY, N. (1998) Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 39, 101-110
- GIAOURIS, E., HEIR, E., HEBRAUD, M., CHORIANOPOULOS, N., LANGSRUD, S., MORETRO, T., HABIMANA, O., DESVAUX, M., RENIER, S. & NYCHAS, G. J. (2014) Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Sci* 97, 298-309

- GILL, C. O. (1976) Substrate Limitation of Bacterial Growth at Meat Surfaces. *Journal of Applied Bacteriology* 41, 401-410
- GILL, C. O. (1979) Intrinsic bacteria in meat. *Journal of Applied Microbiology* 47, 367-378
- GILL, C. O. (1983) Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat. *J Food Prot* 46, 444-452
- GILL, C. O. (1996) Extending the storage life of raw chilled meats. *Meat Sci* 43, 99-109
- GILL, C. O. (2003) Active packaging in practice: meat. In *Novel Food Packaging Techniques*. Hrsg. AHVENAIENEN, R., Woodhead Publishing in Food Science and Technology. 365-383
- GILL, C. O. (2004) Visible contamination on animals and carcasses and the microbiological condition of meat. *J Food Prot* 67, 413-419
- GILL, C. O. & BRYANT, J. (1992) The contamination of pork with spoilage bacteria during commercial dressing, chilling and cutting of pig carcasses. *International Journal of Food Microbiology* 16, 51-62
- GILL, C. O. & BRYANT, J. (1993) The presence of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* in pig carcass dehairing equipment. *Food Microbiol* 10, 337-344
- GILL, C. O. & HARRISON, J. C. L. (1989) The storage life of chilled pork packaged under carbon dioxide. *Meat Sci* 26, 313-324
- GILL, C. O. & JEREMIAH, L. E. (1991) The storage life of non-muscle offals packaged under vacuum or carbon dioxide. *Food Microbiol* 8, 339-353
- GILL, C. O. & NEWTON, K. G. (1977) The Development of Aerobic Spoilage Flora on Meat Stored at Chill Temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 43, 189-195

GILL, C. O. & NEWTON, K. G. (1978) The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. *Meat Sci* 2, 207-217

GILL, C. O. & NEWTON, K. G. (1980) Growth of Bacteria on Meat at Room Temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 49, 315-323

GILL, C. O. & NEWTON, K. G. (1982) Effect of lactic acid concentration on growth on meat of Gram-negative psychrotrophs from a meatworks. *Applied and Environmental Microbiology* 43, 284

GILL, C. O. & PENNEY, N. (1977) Penetration of bacteria into meat. *Applied and Environmental Microbiology* 33, 1284

GILL, C. O. & TAN, K. H. (1980) Effect of Carbon Dioxide on Growth of Meat Spoilage Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 317

GLYNN, M. K., REDDY, V., HUTWAGNER, L., RABATSKY-EHR, T., SHIFERAW, B., VUGIA, D. J., SEGLER, S., BENDER, J., BARRETT, T. J. & ANGULO, F. J. (2004) Prior Antimicrobial Agent Use Increases the Risk of Sporadic Infections with Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium: A FoodNet Case-Control Study, 1996–1997. *Clinical Infectious Diseases* 38, S227-S236

GRAM, L., CHRISTENSEN, A. B., RAVN, L., MOLIN, S. & GIVSKOV, M. (1999) Production of Acylated Homoserine Lactones by Psychrotrophic Members of the *Enterobacteriaceae* Isolated from Foods. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3458

GRAM, L., RAVN, L., RASCH, M., BRUHN, J. B., CHRISTENSEN, A. B. & GIVSKOV, M. (2002) Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 78, 79-97

GRAU, F. M. (1986) Microbial ecology of meat and poultry. *Advances in meat research*. 2, 1-47



GRIBBLE, A. & BRIGHTWELL, G. (2013) Spoilage characteristics of *Brochothrix thermosphacta* and *campestris* in chilled vacuum packaged lamb, and their detection and identification by real time PCR. Meat Sci 94, 361-368

GRIBBLE, A., MILLS, J. & BRIGHTWELL, G. (2014) The spoilage characteristics of *Brochothrix thermosphacta* and two psychrotolerant *Enterobacteriaceae* in vacuum packed lamb and the comparison between high and low pH cuts. Meat Sci 97, 83-92

GUENTZEL, M. N. (1996) Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus. In Medical Microbiology, 4th edition. Hrsg. BARON, S., Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston

HANDELSBLATT (2013) Lebensmittelskandale. Ekel, Gift und Gammel. [https://www.handelsblatt.com/arts\\_und\\_style/aus-aller-welt/lebensmittelskandale-ekel-gift-und-gammel/7764768.html](https://www.handelsblatt.com/arts_und_style/aus-aller-welt/lebensmittelskandale-ekel-gift-und-gammel/7764768.html). Letzter Zugriff 07.09.2020

HANNA, M. O., VANDERZANT, C., SMITH, G. C. & SAVELL, J. W. (1981) Packaging of Beef Loin Steaks in 75% O<sub>2</sub> Plus 25% CO<sub>2</sub>. II. Microbiological Properties. J Food Prot 44, 928-933

HANSON, B. M., DRESSLER, A. E., HARPER, A. L., SCHEIBEL, R. P., WARDYN, S. E., ROBERTS, L. K., KROEGER, J. S. & SMITH, T. C. (2011) Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. Journal of Infection and Public Health 4, 169-174

HAYES, P. R. (1985) Food Microbiology and Hygiene, Elsevier Science Publishers Ltd.

HÖLL, L., BEHR, J. & VOGEL, R. F. (2016) Identification and growth dynamics of meat spoilage microorganisms in modified atmosphere packaged poultry meat by MALDI-TOF MS. Food Microbiol 60, 84-91

HOLZAPFEL, W. H. (1998) The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products. In *The Microbiology of Meat and Poultry*. Hrsg. BOARD, R. G., DAVIES, A. R. London, Blackie Academic and Professional

HUFFMAN, R. D. (2002) Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. *Meat Sci* 62, 285-294

HUIS IN'T VELD, J. H. J. (1996) Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* 33, 1-18

HULTMAN, J., RAHKILA, R., ALI, J., ROUSU, J. & BJORKROTH, K. J. (2015) Meat Processing Plant Microbiome and Contamination Patterns of Cold-Tolerant Bacteria Causing Food Safety and Spoilage Risks in the Manufacture of Vacuum-Packaged Cooked Sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 7088-7097

INGRAM, M. & DAINITY, R. H. (1971) Changes Caused by Microbes in Spoilage of Meats. *Journal of Applied Bacteriology* 34, 21-39

JÄÄSKELAINEN, E., HULTMAN, J., PARSHINTSEV, J., RIEKKOLA, M. L. & BJORKROTH, J. (2016) Development of spoilage bacterial community and volatile compounds in chilled beef under vacuum or high oxygen atmospheres. *Int J Food Microbiol* 223, 25-32

JAY, J. M., VILAI, J. P. & HUGHES, M. E. (2003) Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5–7 °C. *International Journal of Food Microbiology* 81, 105-111

JAWETZ, E., MELNICK, J. L. & ADELBERG, E. A. (2013) *Medizinische Mikrobiologie*, Springer-Verlag

JEREMIAH, L. (2001) Packaging alternatives to deliver fresh meat using shorter long-term distribution. *Food Research International* 34, 749-772

- JIANG, Y., GAO, F., XU, X. L., SU, Y., YE, K. P. & ZHOU, G. H. (2010) Changes in the bacterial communities of vacuum-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR–DGGE. *Meat Sci* 86, 889-895
- JOHANSON, L., UNDERDAL, B., GROSLAND, K., WHELEHAN, O. P. & ROBERTS, T. A. (1983) A survey of the hygienic quality of beef and pork carcasses in Norway. *Acta Vet Scand* 24, 1-13
- KAMENÍK, J. (2013) The microbiology of meat spoilage: a review. *Journal of Food Science*
- KLEEREBEZEM, M., QUADRI, L. E. N., KUIPERS, O. P. & DE VOS, W. M. (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* 24, 895-904
- KLOOS, W. E. & BANNERMAN, T. L. (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 7, 117
- KOCH, H. & FUCHS, M. (2016) Die Fabrikation feiner Fleisch- und Wurstwaren. Frankfurt am Main, Deutscher Fachverlag GmbH
- KÖCK, R., CUNY, C. & WALTHER, B. (2013a) MRSA bei Haustieren: Bedeutung für den Menschen. *Hyg Med* 38 - 7/8, 284-287
- KÖCK, R., SCHAUMBURG, F., MELLMANN, A., KÖKSAL, M., JURKE, A., BECKER, K. & FRIEDRICH, A. W. (2013b) Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as Causes of Human Infection and Colonization in Germany. *Plos One* 8, e55040
- KONRAD, R. & BUSCH, U. (2010) PCR und Real-Time PCR. In *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*. Hrsg. BUSCH, U., Springer. 35-47
- KOUTSOUMANIS, K. (2001) Predictive Modeling of the Shelf Life of Fish under Nonisothermal Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1821

KOUTSOUMANIS, K. & NYCHAS, G.-J. E. (1999) Chemical and Sensory Changes Associated with Microbial Flora of Mediterranean Boque Stored Aerobically at 0, 3, 7, and 10°C. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 698

KOUTSOUMANIS, K. & NYCHAS, G.-J. E. (2000) Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. *International Journal of Food Microbiology* 60, 171-184

KOUTSOUMANIS, K., STAMATIOU, A., SKANDAMIS, P. & NYCHAS, G. J. E. (2006) Development of a Microbial Model for the Combined Effect of Temperature and pH on Spoilage of Ground Meat, and Validation of the Model under Dynamic Temperature Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 124

KOUTSOUMANIS, K. & TAOUKIS, P. S. (2005) 23-Meat safety, refrigerated storage and transport: modeling and management. In *Improving the Safety of Fresh Meat*. Hrsg. SOFOS, J. N., Woodhead Publishing. 503-561

KOUTSOUMANIS, K. (2009) Modeling Food Spoilage in Microbial Risk Assessment. *J Food Prot* 72, 425-427

LA STORIA, A., FERROCINO, I., TORRIERI, E., DI MONACO, R., MAURIELLO, G., VILLANI, F. & ERCOLINI, D. (2012) A combination of modified atmosphere and antimicrobial packaging to extend the shelf-life of beefsteaks stored at chill temperature. *International Journal of Food Microbiology* 158, 186-194

LABADIE, J. (1999) Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Sci* 52, 299-305

LABUZA, T. P. & FU, B. (1993) Growth kinetics for shelf-life prediction: Theory and practice. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 309-323

LAMBERT, A. D., SMITH, J. P. & DODDS, K. L. (1991) Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat - a review. *Food Microbiol* 8, 267-297

LE LOIR, Y., BARON, F. & GAUTIER, M. (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and molecular research: GMR 2, 63-76

LEBENSMITTELHYGIENE-VERORDNUNG (LMHV) idF der Bek. v. 21.06.2016 (BGBl. I S. 1469), zul. geänd. d. V v. 03.01.2018 (BGBl. I S. 99).

LEBERT, I., BEGOT, C. & LEBERT, A. (1998) Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8–7.0), water activity (0.97–1.00) and temperature (7–25°C). International Journal of Food Microbiology 39, 53-60

LEE, B. H., SIMARD, R. E., LALEYE, L. C. & HOLLEY, R. A. (1985) Effects of temperature and storage duration on the microflora, physicochemical and sensory changes of vacuum- or nitrogen-packed pork. Meat Sci 13, 99-112

LEE, D. H., KIM, J.-B., KIM, M., ROH, E., JUNG, K., CHOI, M., OH, C., CHOI, J., YUN, J. & HEU, S. (2013) Microbiota on Spoiled Vegetables and Their Characterization. J Food Prot 76, 1350-1358

LEISNER, J. J., GREER, G. G. & STILES, M. E. (1996) Control of beef spoilage by a sulfide-producing *Lactobacillus sake* strain with bacteriocinogenic *Leuconostoc gelidum* UAL187 during anaerobic storage at 2 degrees C. Applied and Environmental Microbiology 62, 2610

LEISTNER, L. (1992) Food preservation by combined methods. Food Research International 25, 151-158

LEISTNER, L. & RÖDEL, W. (1975) The Significance of Water Activity for Micro-Organisms in Meats. In Water Relations of foods. Hrsg. DUCKWORTH, R. B. London, Academic Press. 309-325

LEITSÄTZE FÜR FLEISCH UND FLEISCHERZEUGNISSE (2015) Neufassung vom 25.11.2015 (BA nz AT 23.12.2015 B4, GMBI 2015 S. 1357), zuletzt geändert durch die Bekanntmachung vom 17.04.2019 (BA nz AT 09.05.2019 B1, GMBI 2019 S. 319).

- LEMMON, G. H. & GARDNER, S. N. (2008) Predicting the sensitivity and specificity of published real-time PCR assays. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 7, 18
- LEROI, F., FALL, P. A., PILET, M. F., CHEVALIER, F. & BARON, R. (2012) Influence of temperature, pH and NaCl concentration on the maximal growth rate of *Brochothrix thermosphacta* and a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Food Microbiol* 31, 222-228
- LEROY, F., VERLUYTEN, J. & DE VUYST, L. (2006) Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106, 270-285
- LI, M., TIAN, L., ZHAO, G., ZHANG, Q., GAO, X., HUANG, X. & SUN, L. (2014) Formation of biogenic amines and growth of spoilage-related microorganisms in pork stored under different packaging conditions applying PCA. *Meat Sci* 96, 843-848
- LITZINGER, S. & MAYER, C. (2010) The Murein Sacculus. In *Prokaryotic Cell Wall Compounds. Structure and Biochemistry*. Hrsg. KÖNIG, H., CLAUS, H., VARMA, A. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag
- LÜCKE, F.-K. (2000) Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci* 56, 105-115
- MACK, D. (1999) Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Journal of Hospital Infection* 43, S113-S125
- MARCELLETTI, S. & SCORTICHINI, M. (2014) Definition of Plant-Pathogenic *Pseudomonas* Genomespecies of the *Pseudomonas syringae* Complex Through Multiple Comparative Approaches. *Phytopathology®* 104, 1274-1282
- MARIUTTI, L. R. B. & BRAGAGNOLO, N. (2017) Influence of salt on lipid oxidation in meat and seafood products: A review. *Food Research International* 94, 90-100

- MARTINEAU, F., PICARD, F. J., KE, D., PARADIS, S., ROY, P. H., OUELLETTE, M. & BERGERON, M. G. (2001) Development of a PCR Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Levels. *Journal of clinical microbiology* 39, 2541
- MC LEAN, R. A. & SULZBACHER, W. I. (1953) *Microbacterium thermosphactum*, spec nov; a nonheat resistant bacterium from fresh pork sausage. *J Bacteriol* 65 65
- MCCLURE, P. J., BARANYI, J., BOOGARD, E., KELLY, T. M. & ROBERTS, T. A. (1993) A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology* 19, 161-178
- MCKEE, L. H. (1995) Microbial contamination of spices and herbs: A review. *LWT - Food Science and Technology* 28, 1-11
- MCMEEKIN, T. A. (1975) Spoilage Association of Chicken Breast Muscle. *Applied Microbiology* 29, 44
- MCMULLEN, L. M. & STILES, M. E. (1994) Quality of fresh retail pork cuts stored in modified atmosphere under temperature conditions simulating export to distant markets. *Meat Sci* 38, 163-177
- MCORIST, A. L., JACKSON, M. & BIRD, A. R. (2002) A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *J Microbiol Methods* 50, 131-139
- MEAD, G. C. (2004) Microbiological quality of poultry meat: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science* 6, 135-142
- MEDVEĐOVÁ, A. & VALÍK, Ľ. (2012) *Staphylococcus aureus*: Characterisation and Quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese Production. In *Structure and Function of Food Engineering*

- METAXOPOULOS, J., KRITIKOS, D. & DROSINOS, E. H. (2003) Examination of microbiological parameters relevant to the implementation of GHP and HACCP system in Greek meat industry in the production of cooked sausages and cooked cured meat products. *Food Control* 14, 323-332
- MOLIN, G. & TERNSTRÖM, A. (1982) Numerical taxonomy of psychrotrophic pseudomonads. *Journal of General Microbiology* 128, 1249-1264
- MOSSEL, D. A. A. (1971) Physiological and metabolic attributes of microbial groups associated with foods. *Journal of Applied Bacteriology* 34, 95-&
- NEWELL, D. G., KOOPMANS, M., VERHOEF, L., DUIZER, E., AIDARA-KANE, A., SPRONG, H., OPSTEEGH, M., LANGELAAR, M., THREFALL, J., SCHEUTZ, F., DER GIESSEN, J. V. & KRUSE, H. (2010) Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology* 139, S3-S15
- NIEMINEN, T. T., KOSKINEN, K., LAINE, P., HULTMAN, J., SÄDE, E., PAULIN, L., PALORANTA, A., JOHANSSON, P., BJÖRKROTH, J. & AUVINEN, P. (2012) Comparison of microbial communities in marinated and unmarinated broiler meat by metagenomics. *International Journal of Food Microbiology* 157, 142-149
- NIEMINEN, T. T., NUMMELA, M. & BJÖRKROTH, J. (2015) Packaging gas selects lactic acid bacterial communities on raw pork. *Journal of Applied Microbiology* 119, 1310-1316
- NORMANNO, G., LA SALANDRA, G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N. C., CORRENTE, M., PARISI, A., SANTAGADA, G., FIRINU, A., CRISSETTI, E. & CELANO, G. V. (2007) Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 115, 290-296



- NYCHAS, G.-J. E., MARSHALL, D. L. & SOFOS, J. N. (2007) Meat, Poultry, and Seafood. In Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition, American Society of Microbiology
- NYCHAS, G.-J. E., SKANDAMIS, P. N., TASSOU, C. C. & KOUTSOUMANIS, K. P. (2008) Meat spoilage during distribution. *Meat Sci* 78, 77-89
- NYCHAS, G. J., DROSINOS, E. H. & BOARD, R. G. (1998) Chemical changes in stored meat. In The microbiology of meat and poultry. Hrsg. DAVIES, A. R., BOARD, R. G., Blackie Academic and Professional. 288-326
- ODEYEMI, O. A., ALEGBELEYE, O. O., STRATEVA, M. & STRATEV, D. (2020) Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2020, 1 - 21
- OJER-USOZ, E., GONZÁLEZ, D., VITAS, A. I., LEIVA, J., GARCÍA-JALÓN, I., FEBLES-CASQUERO, A. & ESCOLANO, M. D. L. S. (2013) Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Sci* 93, 316-321
- OLSSON, C., AHRNÉ, S., PETTERSSON, B. & MOLIN, G. (2003) The bacterial flora of fresh and chill-stored pork: analysis by cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *International Journal of Food Microbiology* 83, 245-252
- PENNACCHIA, C., ERCOLINI, D. & VILLANI, F. (2009) Development of a Real-Time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled raw meat. *Int J Food Microbiol* 134, 230-236
- PENNACCHIA, C., ERCOLINI, D. & VILLANI, F. (2011) Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiol* 28, 84-93
- PETRUZZELLI, A., OSIMANI, A., PASQUINI, M., CLEMENTI, F., VETRANO, V., PAOLINI, F., FOGLINI, M., MICCI, E., PAOLONI, A. & TONUCCI, F. (2016) Trends in the

microbial contamination of bovine, ovine and swine carcasses in three small-scale abattoirs in central Italy: A four-year monitoring. *Meat Sci* 111, 53-59

PIN, C., GARCÍA DE FERNANDO, G. D. & ORDÓÑEZ, J. A. (2002) Effect of Modified Atmosphere Composition on the Metabolism of Glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4441

PLANCHON, S., GAILLARD-MARTINIE, B., DORDET-FRISONI, E., BELLON-FONTAINE, M. N., LEROY, S., LABADIE, J., HÉBRAUD, M. & TALON, R. (2006) Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Food Microbiology* 109, 88-96

POLZIN, J. M., POLLERT, A., KIRCHNER, B. & POLLERT, M. C. (2016) Duden Wirtschaft von A bis Z: Grundlagenwissen für Schule und Studium, Beruf und Alltag, 6. Auflage, Duden

PU, S., WANG, F. & GE, B. (2010) Characterization of Toxin Genes and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolates from Louisiana Retail Meats. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 299-306

PURKO, M., NELSON, W. O. & WOOD, W. A. (1951) The Associative Action Between Certain Yeasts and Bacterium *Linens*. *J Dairy Sci* 34, 699-705

QUIGLEY, L., O'SULLIVAN, O., STANTON, C., BERESFORD, T. P., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F. & COTTER, P. D. (2013) The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 664-698

RAFII, F. (2014) *Serratia*. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition). Hrsg. BATT, C. A., TORTORELLO, M. L. Oxford, Academic Press. 371-375

RAHKIO, T. M. & KORKEALA, H. J. (1997) Airborne Bacteria and Carcass Contamination in Slaughterhouses. *J Food Prot* 60, 38-42

RATTANASOMBOON, N., BELLARA, S. R., HARDING, C. L., FRYER, P. J., THOMAS, C. R., AL-RUBEAI, M. & MCFARLANE, C. M. (1999) Growth and enumeration of the meat spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*. International Journal of Food Microbiology 51, 145-158

RAY, B. & SPECK, M. L. (1973) Freeze-Injury in Bacteria. CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 4, 161-213

REMENANT, B., JAFFRÈS, E., DOUSSET, X., PILET, M.-F. & ZAGOREC, M. (2015) Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties. Food Microbiol 45, 45-53

REYNISSON, E., LAUZON, H. L., MAGNUSSON, H., ÓLI HREGGVIDSSON, G. & MARTEINSSON, V. T. (2008) Rapid quantitative monitoring method for the fish spoilage bacteria *Pseudomonas*. Journal of Environmental Monitoring 10, 1357-1362

RHO, M.-J., CHUNG, M.-S., LEE, J.-H. & PARK, J. (2001) Monitoring of Microbial Hazards at Farms, Slaughterhouses, and Processing Lines of Swine in Korea. J Food Prot 64, 1388-1391

ROBERT KOCH INSTITUT (2016) Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA, RKI-Ratgeber.

[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Staphylokokken\\_MRSA.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Staphylokokken_MRSA.html). Letzter Zugriff 14.08.2020

ROBERTSON, M., HAPCA, S. M., MOSHYNETS, O. & SPIERS, A. J. (2013) Air-liquid interface biofilm formation by psychrotrophic pseudomonads recovered from spoiled meat. Antonie van Leeuwenhoek 103, 251-259

RÖDEL, W. (1993) Water activity and its measurement in food. In Instrumentation and sensors for the food industry. Hrsg. KRESS-ROGERS, E., BRIMELOW, C. J. B. Oxford, Butterworth-Heinemann Ltd. 375-415

- RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., JOFRÉ, A., AYMERICH, T., HUGAS, M. & PLA, M. (2004) Rapid Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Meat Products by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6299
- ROUGER, A., MORICEAU, N., PRÉVOST, H., REMENANT, B. & ZAGOREC, M. (2018) Diversity of bacterial communities in French chicken cuts stored under modified atmosphere packaging. *Food Microbiol* 70, 7-16
- ROUGER, A., TRESSE, O. & ZAGOREC, M. (2017) Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. *Microorganisms* 5, 50
- RUARO, A., ANDRIGHETTO, C., TORRIANI, S. & LOMBARDI, A. (2013) Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. *Food Microbiol* 34, 106-111
- RUSSO, F., ERCOLINI, D., MAURIELLO, G. & VILLANI, F. (2006) Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. *Food Microbiol* 23, 797-802
- SÄDE, E., MURROS, A. & BJÖRKROTH, J. (2013) Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. *Food Microbiol* 34, 252-258
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491
- SAKALA, R. M., HAYASHIDANI, H., KATO, Y., HIRATA, T., MAKINO, Y., FUKUSHIMA, A., YAMADA, T., KANEUCHI, C. & OGAWA, M. (2002) Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. *International Journal of Food Microbiology* 74, 87-99

- SAMELIS, J. (2006) Managing microbial spoilage in meat industry. In Food Spoilage Microorganisms. Hrsg. BLACKBURN, C. W. Cambridge, Woodhead Publishing Limited. 213-286
- SCHELIN, J., WALLIN-CARLQUIST, N., THORUP COHN, M., LINDQVIST, R. & BARKER, G. C. (2011) The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence* 2, 580-592
- SCHIERACK, P., WALK, N., REITER, K., WEYRAUCH, K. D. & WIELER, L. H. (2007) Composition of intestinal *Enterobacteriaceae* populations of healthy domestic pigs. *Microbiology* 153, 3830-3837
- SCHWAIGER, K., HUTHER, S., HÖLZEL, C., KÄMPF, P. & BAUER, J. (2012) Prevalence of antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from chicken and pork meat purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany. *International Journal of Food Microbiology* 154, 206-211
- SCOTT, W. (1953) Water Relations of *Staphylococcus Aureus* At 30°C. *Australian Journal of Biological Sciences* 6, 549-564
- SEO, Y.-S., LEE, D. Y., RAYAMAHJI, N., KANG, M. L. & YOO, H. S. (2008) Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. *Research in Veterinary Science* 85, 433-438
- SERDELIDIS, D. & ANGELIDIS, A. S. (2017) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a controversial food-borne pathogen. *Lett Appl Microbiol* 64, 409-418
- SERRAINO, A., BARDASI, L., RIU, R., PIZZAMIGLIO, V., LIUZZO, G., GALLETTI, G., GIACOMETTI, F. & MERIALDI, G. (2012) Visual evaluation of cattle cleanliness and correlation to carcass microbial contamination during slaughtering. *Meat Sci* 90, 502-506
- SEYDIM, A. C., ACTON, J. C., HALL, M. A. & DAWSON, P. L. (2006) Effects of packaging atmospheres on shelf-life quality of ground ostrich meat. *Meat Sci* 73, 503-510

- SHALE, K., LUES, J. F. R., VENTER, P. & BUYS, E. M. (2005) The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. *Food Microbiol* 22, 433-438
- SHAW, B. G. & HARDING, C. D. (1984) A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. *Journal of Applied Bacteriology* 56, 25-40
- SHAW, B. G. & LATTY, J. B. (1982) A numerical taxonomic study of *Pseudomonas* strains from spoiled meat. *Journal of Applied Bacteriology* 52, 219-228
- SIGNORINI, M., PONCE-ALQUICIRA, E. & GUERRERO-LEGARRETA, I. (2007) Proteolytic and Lipolytic Changes in Beef Inoculated with Spoilage Microorganisms and Bioprotective Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Properties* 6, 147-163
- SINGH, P., WANI, A. A., SAENGERLAUB, S. & LANGOWSKI, H.-C. (2011) Understanding Critical Factors for the Quality and Shelf-life of MAP Fresh Meat: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51, 146-177
- SINGH, R. P. & ANDERSON, B. A. (2004) The major types of food spoilage: an overview. In *Understanding and measuring the shelf-life of food*. Hrsg. STEELE, R. USA, Woodhead Publishing Limited. 3-23
- SNEATH, P. & JONES, D. (1976) *Brochothrix*, a new genus tentatively placed in the family *Lactobacillaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 26, 102-104
- STAINER, R. Y., PALLERONI, N. J. & DOUDORFF, M. (1966) The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol* 43, 159-271
- STANBOROUGH, T., FEGAN, N., POWELL, S. M., SINGH, T., TAMPLIN, M. & CHANDRY, P. S. (2018) Genomic and metabolic characterization of spoilage-associated *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology* 268, 61-72

STANBRIDGE, L. H. & DAVIES, A. R. (1998) The microbiology of chill stored meat. In *The Microbiology of Meat and Poultry*. Hrsg. DAVIES, A. R., BOARD, R. G. London, Blackie Academic and Professional. 174-219

STECHER, B., DENZLER, R., MAIER, L., BERNET, F., SANDERS, M. J., PICKARD, D. J., BARTHEL, M., WESTENDORF, A. M., KROGFELT, K. A., WALKER, A. W., ACKERMANN, M., DOBRINDT, U., THOMSON, N. R. & HARDT, W.-D. (2012) Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal *Enterobacteriaceae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 1269

STELLATO, G., LA STORIA, A., DE FILIPPIS, F., BORRIELLO, G., VILLANI, F. & ERCOLINI, D. (2016) Overlap of Spoilage-Associated Microbiota between Meat and the Meat Processing Environment in Small-Scale and Large-Scale Retail Distributions. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 4045-4054

STELLATO, G., UTTER, D. R., VOORHIS, A., DE ANGELIS, M., EREN, A. M. & ERCOLINI, D. (2017) A Few *Pseudomonas* Oligotypes Dominate in the Meat and Dairy Processing Environment. *Frontiers in Microbiology* 8, 264

STODDARD, S. F., SMITH, B. J., HEIN, R., ROLLER, B. R. K. & SCHMIDT, T. M. (2015) rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic acids research* 43, D593-D598

TALON, R., GRIMONT, P., GRIMONT, F., GASSER, F. & BOEUFGRAS, J. (1988) *Brochothrix campestris* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 38, 99-102

TSIGARIDA, E. & NYCHAS, G. J. E. (2001) Ecophysiological attributes of a *Lactobacillus* sp. and a *Pseudomonas* sp. on sterile beef fillets in relation to storage temperature and film permeability. *Journal of Applied Microbiology* 90, 696-705

ULRICH, R. L. & HUGHES, T. A. (2001) A rapid procedure for isolating chromosomal DNA from *Lactobacillus* species and other Gram-positive bacteria. *Lett Appl Microbiol* 32, 52-56

VAN RIJEN, M. M. L., VAN KEULEN, P. H. & KLUYTMANS, J. A. (2008) Increase in a Dutch Hospital of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Related to Animal Farming. *Clinical Infectious Diseases* 46, 261-263

VASUDEVAN, P., NAIR, M. K. M., ANNAMALAI, T. & VENKITANARAYANAN, K. S. (2003) Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol* 92, 179-185

VERORDNUNG (EG) Nr. 178/2002 vom 28.01.2002 (ABl. L 31 vom 01.02.2002, S. 1), zul. geänd. d. Verordnung (EU) 2019/1381 vom 20.06.2019 (ABl. L 231 vom 06.09.2019, S. 1).

VERORDNUNG (EG) Nr. 852/2004 vom 29.04.2004 (ABl. L 139 vom 30.04.2004, S. 1), zul. geänd. d. Verordnung (EG) Nr. 219/2009 vom 11.03.2009 (ABl. L 87 vom 31.03.2009, S. 109).

VERORDNUNG (EG) Nr. 853/2004 vom 29.04.2004 (ABl. L 139 vom 30.04.2004, S. 55), zul. geänd. d. Verordnung (EU) 2019/1243 vom 20.06.2019 (ABl. L 198 vom 25.7.2019, S. 241).

VERORDNUNG (EG) Nr. 2073/2005 vom 15.11. 2005 (ABl. L 338 vom 22.12.2005, S. 1), zul. geänd. d. Verordnung (EU) 2020/205 vom 14.02.2020 (ABl. L 43 vom 17.2.2020, S. 63)

WANG, L., LI, Y. & MUSTAPHA, A. (2007) Rapid and Simultaneous Quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in Ground Beef by Multiplex Real-Time PCR and Immunomagnetic Separation†. *J Food Prot* 70, 1366-1372

WICKRAMASINGHE, N. N., RAVENSDALE, J., COOREY, R., CHANDRY, S. P. & DYKES, G. A. (2019) The Predominance of Psychrotrophic Pseudomonads on Aerobically Stored Chilled Red Meat. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18, 1622-1635



WIENEKE, A. A., ROBERTS, D. & GILBERT, R. J. (1993) Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969–90. *Epidemiology and Infection* 110, 519-531

WIRTANEN, G., SALO, S., HELANDER, I. M. & MATTILA-SANDHOLM, T. (2001) Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 20, 37-50

WOLFFS, P., KNUTSSON, R., NORLING, B. & RÅDSTRÖM, P. (2004) Rapid Quantification of *Yersinia enterocolitica* in Pork Samples by a Novel Sample Preparation Method, Flotation, Prior to Real-Time PCR. *Journal of clinical microbiology* 42, 1042

XU, Z. & KNIGHT, R. (2015) Dietary effects on human gut microbiome diversity. *British Journal of Nutrition* 113, S1-S5

ZWEIFEL, C., BALTZER, D. & STEPHAN, R. (2005) Microbiological contamination of cattle and pig carcasses at five abattoirs determined by swab sampling in accordance with EU Decision 2001/471/EC. *Meat Sci* 69, 559-566

## 9 Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese interessante Arbeit unter seiner Leitung anzufertigen. Besonders danke ich ihm für das Vertrauen, das er mir schon während meines Studiums entgegenbrachte, als ich zwei VetResearch Projekte unter seiner Leitung durchführen durfte. Durch seine fortlaufende Unterstützung konnte ich anschließend dieses Projekt bearbeiten.

Ich möchte außerdem Frau Prof. Dr. Karin Schwaiger besonders danken, die das Projekt geleitet und mich hervorragend betreut hat; sie hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und gab mir stets neue Denkanstöße.

Ich danke auch besonders Herrn Dr. Samart Dorn-In für die großartige Einarbeitung in den Themenkomplex der Molekularbiologie, seine Unterstützung und Beratung in allen Angelegenheiten und seine geduldige Betreuung.

Ferner danke ich der Bayerischen Forschungstiftung und der TUEV SUEDE ELAB GmbH für ihre finanzielle Unterstützung. Der Rational AG danke ich für die Bereitstellung von Geräten zur Durchführung des Projektes und den Metzgereien Stocker Hofpfisterei GmbH Landfrau in Emmering, Max in Hof und Moser in Landsberg am Lech danke ich für die Bereitstellung von Frischfleisch als Probematerial.

Herzlichen Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für ihre große Unterstützung. Besonders möchte ich mich bei Frau Verena Hohenester, Frau Barbara Fritz, Frau Erika Altgenug, Frau Julia Mühlmeier und Frau Ilona Fitzek für ihre engagierte Hilfe bei der Umsetzung des Projektes bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Philipp-Michael Beindorf und Herrn Johannes Köck für Ihre tatkräftige Mithilfe. Frau Dr. Ulrike Friedlein, Frau Dr. Julia Ekruth, Frau Emma Kaeder, Frau Sarah Eichhorn und Herrn Dr. Florian Kaltner danke ich von Herzen für Ihre Kollegialität und Freundschaft.

Mein größter und wertschätzender Dank gilt meinem Mann Sascha Bahlinger, meinen Eltern Birgit und Dr. Martin Brändl sowie meiner ganzen Familie. Ihre liebevolle Unterstützung und stetige Motivation geben mir von jeher großen Rückhalt und ich bin unfassbar dankbar für ihren unermüdlichen Zuspruch.